

Aus der Klinik für Innere Medizin II,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Professor Dr. med. Frank Lammert

**Prospektive Evaluation von *MYH*-Keimbahnvarianten und
Analyse der Effekte von *MYH*-Intronvarianten auf die Entstehung von
Prä-mRNA-Spleißvarianten als alternative Ursache der
MYH-assoziierten Polyposis**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von: Markus Casper

geb. am: 15.05.1982 in St.Wendel

1 Inhaltsverzeichnis	1
2 Zusammenfassung	6
3 Einleitung	11
3.1 Das kolorektale Karzinom	11
3.1.1 Karzinogenese und Adenom-Karzinom-Sequenz	12
3.1.2 Genetische Prädisposition beim kolorektalen Karzinom	14
3.1.3 Wichtige hereditäre Kolonkarzinomsyndrome	15
3.1.3.1 Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)	15
3.1.3.2 Attenuierte familiäre adenomatöse Polyposis (AFAP)	16
3.1.3.3 Lynch-Syndrom.....	16
3.2. Oxidative DNA Schäden und deren Reparatur	17
3.2.1 Bildung von 8-oxoG und die Folgen	17
3.2.2 Basenexzisionsreparatur (BER).....	18
3.2.3 Reparatur 8-oxoG bedingter Schäden.....	20
3.2.4 Oxidativer Stress bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	22
3.2.4.1 Einteilung und Epidemiologie.....	22
3.2.4.2 Maligne Tumore bei chronisch entzündlicher Darmerkrankung.....	22
3.3 Die DNA-Glykosylase MYH	24
3.3.1 Das <i>MYH</i> -Gen und seine Genprodukte.....	24
3.3.2 Substrate der Glykosylase MYH	25
3.3.3 Funktionelle Domänen und Biochemie	25
3.3.4 Kolonpolypen bei Keimbahnmutationen in <i>MYH</i>	25
3.3.5 Phänotyp bei biallelischer <i>MYH</i> -Inaktivierung.....	28
3.3.6 Karzinogenese bei biallelischer <i>MYH</i> -Inaktivierung	29
3.3.7 Monoallelische <i>MYH</i> -Keimbahnmutationen und ihre Folgen	30
3.4 Vom Gen zum Protein	31
3.4.1 Prä-mRNA-Spleißen	31
3.4.2 Alternatives Spleißen	33
3.4.3 Fehlspleißen und die Folgen	33
4 Fragestellung und Zielsetzung	34
5 Material	35
5.1 Geräte	35
5.1.1 Allgemeine Laborgeräte	35
5.1.2 Elektrophoresegeräte und Zubehör	35
5.1.3 Kühlgeräte.....	35
5.1.4 Analytische Geräte	35

5.2 Chemikalien	36
5.2.1 Allgemeine Chemikalien	36
5.2.2 Molekularbiologische Chemikalien	36
5.2.2.1 Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer	36
5.2.2.2 Primer zur <i>MYH</i> -Analyse	36
5.2.2.2.1 Primer für die Mutagenese von Vektoren	36
5.2.2.2.2 Primer zur <i>MYH</i> -Mutationsanalyse	37
5.2.2.2.3 Primer für die <i>MYH</i> -Spleißanalyse	37
5.2.2.2.4 Primer für die Amplifikation von <i>MYH</i> -Intron 1	37
5.2.2.2.5 Zusätzliche Sequenzierprimer für die <i>MYH</i> -Intron 1-Analyse	38
5.2.2.3 Enzyme	38
5.2.2.4 DNA-Längenstandard und Nukleotide	38
5.3 Verbrauchsmaterialien	38
5.4 Kitsysteme	39
5.5 Vektoren und Bakterien zur Klonierung von DNA	39
5.6 Zugriffsnummern verwendeter Sequenzen	39
5.7 Wichtige Datenbanken und Programme	39
5.8 Statistik	39
5.9 Patienten	40
5.9.1 Genehmigung der Studie	40
5.9.2 Patientenauswahl	40
5.9.3 Charakterisierung der untersuchten Patienten	41
6 Methoden	42
6.1 Allgemeine Methoden	42
6.1.1 Sterilisation von Lösungen und Verbrauchsmaterialien	42
6.1.2 Extraktion von Nukleinsäuren	42
6.1.2.1 Extraktion von DNA aus Gewebeproben	42
6.1.2.2 Extraktion von DNA aus Vollblut	43
6.1.2.3 Extraktion von DNA aus Blutleukozyten	43
6.1.2.4 Extraktion von RNA aus Vollblut	43
6.1.3 Analyse der Ausbeute und Reinheit der Nukleinsäuren	44
6.1.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA	44
6.1.4.1 Auswahl und Herstellung der Gele	44
6.1.4.2 Vorbereitung der Proben	45
6.1.4.3 Durchführung der Elektrophorese	45
6.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
6.1.5.1 Wesentliche Komponenten und allgemeines Pipettierschema	46
6.1.5.2 Herstellung des Nukleotidmixes und der PCR-Puffer	47
6.1.5.3 Durchführung der PCR in einem Thermo-Cycler	48
6.1.6 Reverse-Transkriptase-PCR	48
6.1.6.1 Herstellung des cDNA-Erststranges	48
6.1.6.2 Vermehrung der cDNA	49
6.1.7 Aufreinigung von PCR-Produkten	50
6.1.8 Sequenzierung von DNA	50
6.1.8.1 Durchführung einer Sequenzierungs-PCR	51
6.1.8.2 Aufreinigung der Produkte	51
6.1.8.3 Sequenzanalyse durch Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen	52
6.1.8.4 Direktsequenzierung von Plasmid-DNA	52

6.1.9 Klonierung von PCR-Produkten	52
6.1.9.1 Herstellen von Medien für die Bakterienkultur.....	53
6.1.9.2 Transformation von Bakterien.....	53
6.1.9.3 Selektion und Vermehrung rekombinanter Klone.....	54
6.1.10 Einführen einer Mutation in ein Gen	54
6.1.11 Restriktionsschnitt von DNA.....	55
6.1.12 Minipräparation von Plasmid-DNA	56
6.2 Spezielle Methoden und deren Etablierung.....	57
6.2.1 Nachweis der Mutationen Y165C und G382D	57
6.2.1.1 Vermehrung der zu analysierenden Genabschnitte	57
6.2.1.2 Herstellung der Positiv- und Negativkontrollen.....	58
6.2.1.3 Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme	60
6.2.1.4 Restriktionsverdau der PCR-Produkte	61
6.2.1.5 Identifikation der Mutationsträger im Agarosegel	62
6.2.2 Mutationensanalyse anderer Bereiche des MYH-Gens.....	64
6.2.2.1 Amplifikation der gewünschten Genabschnitte.....	64
6.2.2.2 Auftrennung und Aufreinigung der PCR-Produkte.....	65
6.2.2.3 Sequenzierungsreaktion und Analyse der Basenabfolge.....	66
6.2.3 MYH-Transkriptanalyse	66
6.2.3.1 Herstellung und Vermehrung von cDNA.....	66
6.2.3.2 Gezielte Vermehrung und Analyse einzelner Transkripte	66
6.2.4 Analyse von MYH-Intron 1.....	67
6.2.4.1 Amplifikation des gewünschten Genabschnitts.....	67
6.2.4.2 Analyse der Basenabfolge.....	67
7 Ergebnisse	69
7.1 Screening der beiden Hotspotmutationen Y165C und G382D	69
7.1.1 Vorliegen der Mutationen in der gesunden Normalbevölkerung.....	69
7.1.1.1 Charakterisierung der Patientengruppe	69
7.1.1.2 Häufigkeit mono- und biallelischer Mutationen.....	69
7.1.2 Vorliegen der Mutationen bei Adenom- und Karzinompatienten.....	70
7.1.2.1 Charakterisierung der Patientengruppe	70
7.1.2.2 Biallelischer MYH-Mutationsstatus.....	71
7.1.2.2.1 Häufigkeit biallelischer MYH-Mutationen.....	71
7.1.2.2.2 Der Patient H503 im Vergleich mit anderen Adenompatienten	72
7.1.2.3 Monoallelischer MYH-Mutationsstatus	74
7.1.3 Nachweis von Y165C und G382D bei CED-Patienten.....	74
7.1.3.1 Charakterisierung der Patientengruppen	74
7.1.3.2 Häufigkeit monoallelischer und biallelischer Mutationen.....	74
7.1.4 Mutationsnachweis bei Patienten mit sonstigen Erkrankungen.....	75
7.1.4.1 Charakterisierung der Patientengruppe	75
7.1.4.2 Häufigkeit monoallelischer und biallelischer Mutationen.....	75
7.1.5 Übersicht über die Analyse der Hotspotmutationen.....	75
7.1.6 Bestätigung der positiven Ergebnisse.....	75
7.2 Suche nach Mutationen in weiteren Exons des MYH-Gens	76
7.2.1 Untersuchung aller Patienten mit nachgewiesener Hotspot-Mutation	76
7.2.1.1 Nachweis weiterer Genvarianten.....	76
7.2.1.2 Untersuchung einer Tumorprobe des Patienten H003.....	76
7.2.2 Untersuchung von Patienten mit multiplen Adenomen.....	77
7.2.2.1 Nachweis weiterer Genvarianten.....	77
7.2.3 Häufigkeit von Q324H und IVS 2+30 A>G bei Adenompatienten.....	78
7.3 Häufigkeit der IVS 6+35 G>A-Variante	78

7.4 Patienten mit einer <i>MYH</i>-Genvariante	79
7.5 <i>MYH</i>-Transkriptanalyse bei verschiedenen Intronvarianten.....	83
7.5.1 Bestimmung des Mutationsstatus der Probanden.....	84
7.5.2 Untersuchung der α-Transkripte.....	85
7.5.2.1 267 bp- α -Produkte.....	86
7.5.2.1.1 Häufigkeitsverteilung der alternativ gespleißten Exon 3-Formen	86
7.5.2.1.2 Neue Spleißvarianten bei der Patientin H177	88
7.5.2.1.3 Neue Spleißvarianten bei dem Probanden V1	89
7.5.2.2 578 bp- α -Produkte.....	89
7.5.2.2.1 Häufigkeitsverteilung der alternativ gespleißten Exon 3-Formen	89
7.5.2.2.2 Neue Spleißvarianten bei der Patientin H177	89
7.5.2.2.3 Neue Spleißvarianten bei dem Probanden V1	91
7.5.2.3 Zusammenfassende Betrachtung der α -Transkripte	92
7.5.3 Untersuchung der β-Transkripte.....	93
7.5.3.1 543 bp- β -Produkte.....	94
7.5.3.1.1 Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Exon 3-Formen.....	94
7.5.3.1.2 Auffällige Transkripte der Patientin H177.....	94
7.5.3.1.3 Neue Spleißvarianten bei dem Probanden V1	96
7.5.3.2 614 bp- β -Produkte.....	98
7.5.3.2.1 Häufigkeitsverteilung der alternativen Exon 3-Formen.....	98
7.5.3.2.2 Neue Spleißvarianten bei der Patientin H177 und dem Probanden V2	98
7.5.3.3 Zusammenfassende Betrachtung der β -Transkripte	99
8 Diskussion.....	101
8.1 Studiendesign und Patientenkollektiv.....	101
8.2 Häufigkeit von <i>MYH</i>-Keimbahnvarianten	102
8.2.1 Bestimmung der Allelfrequenz von Y165C und G382D.....	102
8.2.1.1 Bestimmung der Allelfrequenz in der Normalbevölkerung	102
8.2.1.2 Häufigkeit der Hotspotmutationen bei Patienten mit Adenomen und Karzinomen ...	103
8.2.1.3 Häufigkeit der Hotspotmutationen bei Patienten mit CED	104
8.2.2 Häufigkeit weiterer Mutationen und ihre Bedeutung	104
8.2.3 Exonische und intronische Varianten unklarer Pathogenität.....	107
8.2.3.1 Häufigkeit und Bedeutung exonischer Genvarianten.....	107
8.2.3.2 Häufigkeit und Bedeutung intronischer Genvarianten.....	108
8.3 Phänotyp bei verschiedenen genotypischen Konstellationen.....	110
8.3.1 Inaktivierung beider Allele durch sicher pathogene Mutationen.....	110
8.3.1.1 Anzahl der Adenome bei MAP am Beispiel des Patienten H503	110
8.3.1.2 Maligne Entartung der <i>MYH</i> -assoziierten Adenome.....	114
8.3.1.3 Histologie und Verteilung der Neoplasien im Kolon.....	116
8.3.1.4 Extrakolonische Manifestationen der Erkrankung	116
8.3.2 Monoallelische <i>MYH</i>-Mutationen und ihre Folgen.....	117
8.3.2.1 Karzinom- und Polyposisrisiko	117
8.3.2.2 Neoplasierisiko bei zusätzlichem exonischem Polymorphismus	121

8.4 Bedeutung von Spleißvarianten der MYH-Prä-mRNA	122
8.4.1 Vorbeschriebene Spleißvarianten und ihre Bedeutung.....	122
8.4.2 Neue alternative Exon 3-Formen.....	125
8.4.3 Häufigkeitsverteilung der Exon 3-Varianten 1-6.....	127
8.4.4 Konsequenzen der neuen Spleißvarianten auf Proteinebene.....	128
8.4.4.1 Veränderungen im Bereich von Exon 1 α	129
8.4.4.2 Deletion von 56 Basenpaaren in Exon 3	130
8.4.4.3 Verlängerung des Exons 1 β um 237 Basenpaare	131
8.4.4.4 Deletionen einzelner Exons und Verlust mehrerer Exons (Exon-Skipping).....	133
8.4.4.5 Einspleißen von Introns oder Teilen von Introns (Intron-Retention).....	133
8.4.5 Konsequenzen von Intronvarianten und Spleißfehlern.....	134
8.5 MYH-Mutationen bei Patienten mit CED.....	135
8.6 MYH und hyperplastische Polypen.....	137
8.7 Diagnostik und Therapie von Patienten mit MAP.....	137
8.7.1 Wer soll genetisch getestet werden?	137
8.7.2 Mit welchem Verfahren sollte gescreent werden?	139
8.7.3 Welche Therapie und Nachsorge sollte durchgeführt werden?.....	140
9. Schlussfolgerungen, kritische Wertung und Ausblick	142
10. Literaturverzeichnis.....	145
11 Tabellenverzeichnis.....	157
12 Abbildungsverzeichnis.....	158
13 Abkürzungsverzeichnis.....	159
14 Danksagung.....	161
15 Eigene Publikationen und Lebenslauf.....	162

2 Zusammenfassung

Freie Sauerstoffradikale können die Entstehung oxidativ veränderter Purin- und Pyrimidinbasen in der DNA verursachen. Spezifische DNA-Reparatursysteme verhindern die Entstehung von Mutationen als Folge dieser Basenschäden. Die DNA-Glykosylase MYH spielt beim Menschen eine wichtige Rolle bei der Vermeidung von G:C→T:A-Transversionen, indem sie im Rahmen der *base excision repair* (BER) Adenin aus einer Fehlpaarung mit der oxidativ geschädigten Base 8-oxo-7,8-Dihydroguanin (8-oxoG) entfernt. Ein Ausfall von MYH durch Inaktivierung beider Allele des *MYH*-Gens auf Keimbahniveau führt zur genomischen Akkumulation dieser Transversionen und zur späteren Ausbildung einer MYH-assoziierten Polyposis (MAP). Bei Patienten mit einer MAP finden sich zumeist zwischen zehn und 100, seltener über 100 kolorektale Adenome, die in der Regel zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr diagnostiziert werden. Gelegentlich werden auch weniger als zehn Adenome oder früh auftretende kolorektale Karzinome ohne begleitende Polypen beschrieben. Bis heute wurden mehr als 40 pathogene *MYH*-Mutationen identifiziert, wobei Y165C und G382D zusammen mehr als 2/3 der Mutationen ausmachen.

In der vorliegenden Studie wurde die Häufigkeit der *MYH*-Hotspotmutationen Y165C und G382D prospektiv in einem gemischten gastroenterologischen Patientenkollektiv bestimmt und der koloskopische Befund mit dem Mutationsstatus abgeglichen. Durch alternatives Spleißen und Nutzung unterschiedlicher Transkriptionsstartpunkte entstehen verschiedene Varianten des MYH-Proteins, deren funktionelle Bedeutung noch nicht endgültig geklärt ist. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, welche unterschiedlichen MYH-Prä-mRNA-Spleißvarianten existieren und ob intronische *MYH*-Genvarianten das komplexe MYH-Prä-mRNA-Spleißen derart beeinflussen können, dass durch einen daraus resultierenden Funktionsverlust der MYH-Glykosylase eine MAP verursacht werden kann.

Insgesamt wurden 352 Patienten (187 Männer, 165 Frauen, Alter $54,5 \pm 17,6$ Jahre [Range 18-89 Jahre]; 116 mit koloskopischem Normalbefund, 131 mit kolorektalen Adenomen und/oder Karzinomen, 92 mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED) und 13 mit sonstigen Befunden) evaluiert. Nach DNA-Isolation aus einer koloskopisch entnommenen Zangenbiopsie aus unauffälliger Kolonschleimhaut und Amplifikation der *MYH*-Exons 7 und 13 wurden Träger der Y165C- beziehungsweise G382D-Mutation durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *MwoI* und *BglIII* identifiziert. Bei Patienten mit Mutationsnachweis wurden zusätzlich die Exons 2 bis 14 mit den flankierenden Intronabschnitten amplifiziert und sequenziert.

Zur Analyse des komplexen MYH-Prä-mRNA-Spleißens wurde bei einer Patientin mit 19 kolorektalen Adenomen und zwei gesunden Probanden die MYH-mRNA nach RNA-Isolation durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, PCR-amplifiziert und sequenziert.

Eine heterozygote Y165C- oder G382D-Mutation konnte bei fünf beziehungsweise drei Patienten identifiziert werden. Ein Patient mit compound heterozygotem Y165C/G382D-Mutationsstatus, bei dem über einen Zeitraum von 14 Jahren 107 kolorektale Adenome und ein Karzinom entfernt wurden, war der einzige Patient mit biallelischem *MYH*-Mutationsstatus. Aus umfassenden koloskopischen Untersuchungsdaten dieses Patienten lässt sich schließen, dass die MAP zunächst mild mit nur wenigen pro Jahr entstehenden Adenomen beginnt, es im weiteren Verlauf aber zu einem deutlichen Anstieg der jährlich neu auftretenden Adenome kommt. Im Vergleich zu den sonstigen Adenompatienten konnten bei dem MAP-Patienten signifikant häufiger höhergradige Epitheldysplasien, oft bereits in unter 5 mm großen Adenomen, nachgewiesen werden (4,1% vs. 24,3%; $p < 0,001$).

Zwei weitere Patienten mit vier beziehungsweise 19 kolorektalen Adenomen sowie je zwei Patienten mit CED beziehungsweise einem unauffälligen Koloskopiebefund wiesen monoallelische Y165C- oder G382D-Mutationen auf. Bei diesen sechs Patienten wurden neben den vorbeschriebenen Polymorphismen Q324H und IVS 6+35 G>A keine weiteren pathogenen *MYH*-Mutationen nachgewiesen. Ein erhöhtes Adenomrisiko für Träger monoallelischer *MYH*-Mutation ließ sich nicht nachweisen.

Bei der Analyse des MYH-Prä-mRNA-Spleißens wurden bei der Adenompatientin (heterozygote *MYH*-Intronvarianten: IVS 1 β +3430 C>G, IVS 1+5 G>C, IVS 2+30 A>G, IVS 6+35 G>A) und den zwei gesunden Probanden (heterozygote Intronvarianten bei V1: IVS 6+35 G>A, IVS 1 α +314 G>C, IVS 1 β +2900 T>G, IVS 1 β +3430 C>G; keine Variante bei V2) neben den sechs bekannten Spleißformen 21 neue alternativ gespleißte MYH-mRNAs gefunden. Bei der Translation dieser mRNAs entstehen in 19 Fällen vorzeitige Stopkodons und somit nicht funktionsfähige Proteine, in den beiden anderen Fällen kommt es zum Verlust von 14 beziehungsweise 153 Aminosäuren. Die Entstehung einer bestimmten Spleißvariante als Folge einer definierten Intronvariante konnte nicht belegt werden. Die untersuchte Adenompatientin wies insgesamt nicht signifikant mehr fehlgespleißte mRNAs auf als die gesunden Probanden, sodass ihre Polyposis wahrscheinlich nicht durch Spleißfehler aufgrund von *MYH*-Intronvarianten ausgelöst wird.

In der vorliegenden Studie konnten im Gesamtkollektiv insgesamt acht *MYH*-Hotspotmutationen identifiziert werden. Einer von 131 Patienten mit kolorektalen Adenomen und/oder Karzinomen (0,8%) beziehungsweise einer von acht Patienten mit über 15 Adenomen (12,5%) wies eine MAP auf. Die bei diesem Patienten erhobenen Untersuchungsdaten sprechen dafür, dass die bei MAP beschriebenen unterschiedlichen Polypenzahlen entgegen der bisherigen Annahme eher verschiedene Beobachtungszeitpunkte als interindividuell unterschiedliche Phänotypen bei biallelischer *MYH*-Mutation darstellen. Zudem ergaben sich über die erhöhte Dysplasierate bei den MAP-Adenomen Hinweise auf einen beschleunigten Adenomprogress zum Karzinom bei der MAP. Durch alternatives Spleißen kann eine Vielzahl unterschiedlicher *MYH*-mRNA-Varianten entstehen, deren zelluläre Funktion allerdings noch unklar ist. Eine Beeinflussung des Spleißens durch bestimmte *MYH*-Intronvarianten und somit eine mögliche Pathogenität dieser Varianten ließ sich nicht nachweisen. Im klinischen Alltag sollte bei Patienten mit mehr als 10-15 kolorektalen Adenomen oder früh auftretendem kolorektalem Karzinom eine *MYH*-Mutationsdiagnostik initiiert werden.

Prospective evaluation of *MYH* germ line variants and analysis of *MYH* intronic variants' impact on the generation of pre-mRNA-splicing variants as additional causation of MYH-associated polyposis

Reactive oxygen species can cause the development of various oxidized DNA base lesions. By removing adenine mispaired with the base lesion 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) the DNA glycosylase MYH, involved in base excision repair, plays an important part in protecting human cells from the devastating consequences of oxidative DNA damage (G:C→T:A transversions). Lately it has been known that the inactivation of both alleles of the *MYH* gene leads to genomic accumulation of G:C→T:A transversions and a multiple colorectal adenoma phenotype called MYH-associated polyposis (MAP). Affected persons mostly show between ten and 100 colorectal adenomas and less frequently more than 100 adenomas which are usually diagnosed at the age of 40 to 50. Phenotypes with less than ten adenomas or young-onset colorectal carcinomas without accompanying polyps have rarely been reported. Up to now more than 40 pathogenic *MYH* mutations have been described, with Y165C and G382D accounting for more than two thirds of all mutations.

In this prospective study we investigated the frequency of the two hotspot mutations Y165C und G382D in a mixed study population that underwent a colonoscopy (187 men, 165 women, aged $54,5 \pm 17,6$ [range 18-89 years]; 116 with normal colon, 132 with colorectal adenomas and/or carcinomas, 92 with inflammatory bowel disease (IBD) and 13 with other diseases) and evaluated the phenotypical consequences of monoallelic or biallelic *MYH* mutations. Moreover, there are different variants of the MYH glycosylase with unclear functional impact which are generated by alternative splicing and by using different transcription starting points. Our aim was to describe the spectrum of MYH-pre-mRNA-splicing variants more precisely. We also tried to clarify if intronic *MYH* variants can influence MYH-pre-mRNA-splicing and originate MAP by MYH inactivation due to splicing errors.

DNA was extracted from a biopsy that was taken from normal colonic mucosa during colonoscopy. After PCR amplification of *MYH* exons 7 and 13 Y165C and G382D mutation carriers were detected by digestion with *MwoI* and *BgIII*. Exons 2-14 and large parts of the flanking introns were amplified and sequenced in patients with *MYH* mutations. For analysis of MYH-pre-mRNA-splicing mRNA was extracted and translated into cDNA by reverse transcription. Then the cDNA was amplified by PCR and analysed by sequence analysis. We studied the MYH-mRNAs of a patient with 19 colorectal adenomas and compared them with two healthy individuals' mRNAs.

Five patients showed a heterozygous Y165C mutation and three patients were heterozygous carriers of the G382D mutation. One patient was compound heterozygous for both variants and the only biallelic mutation carrier detected in our study. During the last 14 years 107 colonic adenomas and a carcinoma of the sigmoid colon have been removed in this MAP patient. Because of the detailed information we obtained by regular colonoscopy of this patient we assume that adenoma development in MAP initially is slow but then accelerates tremendously over the years. Moreover, there was a significantly higher number of adenomas with mild or severe epithelial dysplasia, preferentially in adenomas smaller than 5 mm, compared with other patients suffering from colorectal adenomas (24,3% vs. 4,1%; $p < 0,001$). Two patients with 4 respectively 19 colorectal adenomas, two persons with IBD and two healthy individuals were monoallelic mutation carriers. None of these six patients had a second pathogenic *MYH* mutation. Only the known *MYH* polymorphisms Q324H and IVS 6+35 G>A were found in three cases. The risk of colorectal adenoma development was not increased in monoallelic mutation carriers.

By mRNA analysis in a polyposis patient (heterozygous intronic *MYH* variants: 1 β +3430 C>G, IVS 1+5 G>C, IVS 2+30 A>G, IVS 6+35 G>A) and two healthy individuals (heterozygous intronic *MYH* variants V1: IVS 6+35 G>A, IVS 1 α +314 G>C, IVS 1 β +2900 T>G, IVS 1 β +3430 C>G; no intronic variants in V2's *MYH* gene) we detected 21 new alternatively spliced mRNAs besides the six known mRNA variants. 19 out of them lead to premature stopcodons and defective proteins. The two remaining variants show deletions of 14 and 153 amino acids. There was no evidence that certain intronic variants cause specific mRNA variants and there was no significant difference between the multiple adenoma patient and the healthy persons concerning the number of mRNAs with splicing errors.

All in all, we detected 8 *MYH* hotspot mutations in the investigated study population. One MAP patient was found among 131 patients with colorectal adenomas and/or colorectal cancer (0,8%) and among 8 patients with more than 15 colorectal adenomas (12,5%). Our findings suggest that the different numbers of adenomas found in MAP patients predominantly depend on the time of investigation rather than on an inter-individual variability of phenotype as it was suggested previously. Furthermore, there seems to be an accelerated progression from adenoma to carcinoma in MAP. 19 new *MYH*-mRNA variants generated by alternative splicing were detected in the present study. However, their detailed cellular function still remains unclear. Intronic *MYH* variants do not affect *MYH*-pre-mRNA-splicing and therefore don't seem to cause MAP. In the daily routine patients with more than 10 or 15 colorectal adenomas or early-onset colorectal cancer should be screened for *MYH* mutations.

3 Einleitung

3.1 Das kolorektale Karzinom

Mit einem Anteil von 24,7% sind Krebserkrankungen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Baltes et al., 2004). Dabei liegt das kolorektale Karzinom mit jährlich über 65.000 Neuerkrankungen in Deutschland sowohl bei den Krebsneuerkrankungen als auch den Krebstodesursachen an der zweiten Stelle (Bertz et al., 2004). Das Lebenszeitrisiko liegt bei 5-6%. Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 68 Jahren bei Männern, beziehungsweise 73 Jahren bei Frauen, handelt es sich beim kolorektalen Karzinom um eine Tumorerkrankung, die bevorzugt im höheren Lebensalter auftritt.

Kolorektale Karzinome gehen vom Zylinderepithel der Kolon-Schleimhaut aus. Dieses Epithel besteht aus nur einer einzigen Zellschicht, die sich innerhalb von fünf bis sechs Tagen ausgehend von sogenannten Krypten durch einen Wanderungs- und Differenzierungsprozess der Epithelzellen vollständig erneuert. Im basalen Bereich dieser fingerförmigen Einstülpungen befinden sich undifferenzierte Stammzellen, von denen mehrere Generationen teilungsfähiger Zellen ausgehen. Diese sorgen dafür, dass absterbende und abgeschilferte Zellen des apikalen Oberflächenepithels in gleichem Maße nachgebildet werden. In den oberen Abschnitten der Krypten liegen nicht mehr teilungsfähige, differenzierte Zellen vor, die dort ihre spezifischen Aufgaben übernehmen (van Leeuwen et al., 2006).

Karzinome treten in den verschiedenen Abschnitten des Dickdarms unterschiedlich häufig auf. Distal der linken Flexur liegen 57-78% der Tumore, wobei mindestens 50% allein auf Kolon sigmoideum und Rektum entfallen (Celestino et al., 1996; Paluszkiewicz et al., 2005). Entsprechend werden lediglich zwischen 14 und 37% der Tumore proximal der linken Flexur gefunden (Nguyen et al., 1991; Fante et al., 1997).

Risikofaktoren für die Entstehung von Darmkrebs sind neben dem Alter und einer nicht zu unterschätzenden genetischen Prädisposition vor allem Ernährungs- und Lebensgewohnheiten (Rauchen, Alkohol, rotes Fleisch, ballaststoffarme Ernährung) (Lieberman et al., 2003). Auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Diabetes mellitus oder Akromegalie sowie nach Uretersigmoideostomie, Cholezystektomie oder Radiatio bei urogenitalen Tumoren besteht ein erhöhtes Risiko am kolorektalen Karzinom zu erkranken.

3.1.1 Karzinogenese und Adenom-Karzinom-Sequenz

Bis auf wenige Ausnahmen entwickeln sich nahezu alle Karzinome des Dickdarms aus gutartigen, präkanzerösen Epithelproliferationen, den Adenomen. Unter dem Begriff der *Adenom-Karzinom-Sequenz* (Jackman und Mayo, 1951) versteht man die regelhafte Abfolge der Entwicklung eines invasiven Karzinoms aus einem Adenom über die Zwischenstufen der niedriggradigen und hochgradigen Epitheldysplasie. Dieser Prozess dauert in der Regel zwischen fünf und 20 Jahren.

Jedoch entsteht nicht zwangsläufig aus jedem Adenom ein Karzinom. Vielmehr ist das Entartungsrisiko von Wuchsform, Größe und histologischem Typ abhängig. Dabei entarten villöse Adenome häufiger als tubulovillöse und diese wiederum häufiger als tubuläre Formen. Breitbasige Adenome entarten wiederum eher als gestielte Adenome. Mit einem Anteil von 15% sind villöse Adenome allerdings deutlich seltener als tubuläre (50%) und tubulovillöse (35%) Adenome.

Die Entwicklung einer kolorektalen Neoplasie setzt voraus, dass sich eine einzige Kolonzelle durch Mutation oder Ausfall proliferationssteuernder Gene unkontrolliert teilen kann und damit einen Wachstumsvorteil gegenüber den übrigen Zellen entwickelt. Dabei können einerseits Protoonkogene (Tab. 1) zu Onkogenen mutieren und für einen von Wachstumsfaktoren unabhängigen, permanenten Proliferationsreiz sorgen. Andererseits können Tumorsuppressorgene (Tab. 1), welche normalerweise die Zellteilung kontrollieren, inaktiviert werden (Calvert und Frucht, 2002).

Tabelle 1: Beim kolorektalen Karzinom häufig mutierte Protoonkogene und Tumorsuppressorgene

Neben den Proteinfunktionen sind auch die vermuteten Folgen bei Inaktivierung sowie die Häufigkeit der betreffenden Mutationen in kolorektalen Karzinomen wiedergegeben (modifiziert nach Chung, 2000).

	Genort	Proteinfunktion	Mutationsfolgen	Häufigkeit
Protoonkogen				
<i>K-ras</i>	12p	Signaltransduktion	Adenomprogress	50%
<i>CTNNB1</i>	3p22	Transkriptionsfaktor	Adenomentstehung	4-15%
<i>SRC</i>	2q11	Tyrosinkinase	Metastasierung	2%
Tumorsuppressorgen				
<i>APC</i>	5q21	β -Catheninbindung	Adenomentstehung	70%
<i>p53</i>	17p13	Zellzykluskontrolle	Übergang zum invasiven Karzinom	50-70%
<i>SMAD4</i>	18q21	Transkriptionsfaktor	Adenomprogress	16%
<i>SMAD2</i>	18q21	Transkriptionsfaktor	Adenomprogress	6%
<i>DCC</i>	18q21	Oberflächenrezeptor	Adenomprogress	3%

Während die Mutation oder Deletion eines Allels bei Protoonkogenen bereits zur Tumorentstehung führen kann, müssen bei einem Tumorsuppressorgen beide Allele verloren gehen (*Two-Hit-Hypothesis*; Knudson, 1985). Entsprechend dem Konzept der morphologischen Adenom-Karzinom-Sequenz wurde basierend auf Mutationsstudien an

präkanzerösem und kanzerösem Kolongewebe ein Modell der sequenziellen Akkumulation genomischer Läsionen bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms entwickelt (Vogelstein et al., 1988). Während die Inaktivierung beider Allele des *APC*-Gens als Auslöser der Adenomentstehung angesehen wird (Powell et al., 1992), scheint der Progress zum malignen Tumor neueren Untersuchungen zufolge weniger von der genauen Reihenfolge denn von der Kombination bestimmter Genalterationen (Abb. 1) abzuhängen (Leslie et al., 2002). Dennoch werden Inaktivierungen der Gene *p53*, *DCC* oder *SMAD* häufig erst in Adenomen mit höhergradigen Dysplasien oder Karzinomen und nur selten in frühen Adenomen gefunden.

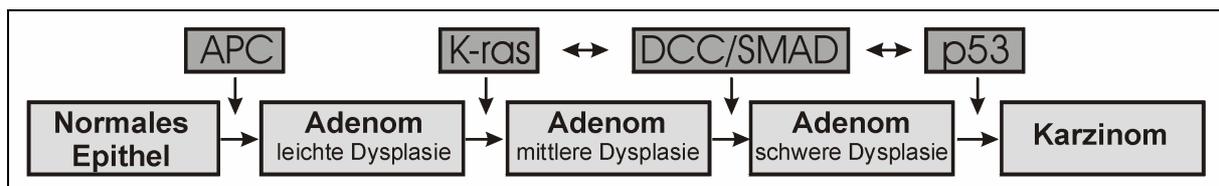


Abbildung 1: Genetisches Tumorprogressionsmodell beim kolorektalen Karzinom (Adenom-Karzinom-Sequenz)

Schrittweise Aktivierung von Protoonkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bedingt die Entstehung von kolorektalen Karzinomen ausgehend von normalem Epithel (nach Vogelstein et al., 1988).

Generell wird davon ausgegangen, dass die Mehrzahl der Mutationen in den langlebigen basalen Stammzellen entsteht. Die wenigen Generationen noch teilungsfähiger Tochterzellen (Transitzellen) verlieren bereits nach wenigen Teilungen ihre Replikationsfähigkeit und leben zu kurz, um beispielsweise somatische Inaktivierungen beider Allele des *APC*-Gens entwickeln zu können. Die erste *APC*-Mutation wird daher zumeist in einer Stammzelle stattfinden, die endgültig zur unkontrollierten Proliferation führende zweite Mutation kann sowohl in der Stammzelle selbst wie auch in allen von der Stammzelle gebildeten, noch teilungsfähigen Tochterzellen entstehen (Komarova und Wang, 2004).

Neben dieser als *gatekeeper pathway* bezeichneten Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen, mit der *APC*-Mutation als Schlüsselereignis, wurde als alternative und seltenere Möglichkeit der kolorektalen Karzinogenese der sogenannte *caretaker pathway* beschrieben. Hierunter versteht man den Ausfall von DNA-Reparaturmechanismen, der innerhalb kurzer Zeit zu einer Häufung von Mutationen im gesamten Genom, und somit auch in den für die Darmkrebsentstehung verantwortlichen Onkogenen und Anti-Onkogenen führt (Kinzler und Vogelstein, 1997). Wichtige an der Entstehung von Darmkrebs beteiligte *caretaker*-Gene sind die *DNA-Mismatch-Reparatur*-Gene *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* aber auch das Base-Excision-Repair-Gen *MYH*.

3.1.2 Genetische Prädisposition beim kolorektalen Karzinom

Sammeln sich die zur Adenom- und Karzinomentstehung nötigen Veränderungen im Laufe von Jahrzehnten als Folge von somatischen Mutationen in einer Körperzelle an, so entsteht aus dieser ein sogenanntes sporadisches Karzinom. Diese sporadischen Karzinome machen ungefähr 70% aller Darmkrebsfälle aus.

Es wird davon ausgegangen, dass bis zu 30% aller kolorektalen Neubildungen familiär oder aufgrund einer eindeutigen genetischen Prädisposition erblich gehäuft vorkommen (Lichtenstein et al., 2000). Beim familiären Darmkrebs wird eine multifaktorielle Vererbung vermutet, das Risiko bei erstgradig Verwandten von erkrankten Personen ist um den Faktor 2-4 erhöht (St. John et al. 1993; Fuchs et al., 1994). Die genaue genetische Grundlage konnte bisher noch nicht geklärt werden (Johns et al., 2001).

Vom hereditären Kolonkarzinom spricht man bei Vorliegen molekulargenetisch und klinisch genau definierter Syndrome. Hier liegt bereits in den elterlichen Keimzellen oder der Zygote ein Allel eines Tumorsuppressor- oder DNA-Reparaturgens verändert vor. Organismen mit Keimbahnmutationen in Protoonkogenen scheinen dagegen nicht lebensfähig zu sein (Jo und Chung 2005). Da in diesen Fällen nur noch der Verlust der gesunden Kopie des betroffenen Gens im Sinne einer somatischen Mutation nötig ist, treten die hereditären Karzinome in deutlich jüngerem Alter auf. Es werden Syndrome mit Auftreten multipler Kolonpolypen wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) (Powell et al. 1993), die attenuierte FAP (Lal und Gallinger 2000), das Turcot-Syndrom (Typ 1 und 2) (Hamilton et al. 1995), das Peutz-Jeghers-Syndrom (McGarrity et al. 2000), die juvenile Polyposis (Howe et al. 1998), das Cowden-Syndrom (Longy und Lacombe 1996), das HMPS (*hereditary mixed polyposis syndrome*) (Whitelaw et al. 1997) und die *MYH*-assoziierte Polyposis (MAP) (Al-Tassan et al. 2002) von Syndromen mit nur vereinzelt Polypen wie dem Lynch-Syndrom (Lynch und Lynch 2000) oder dem Muir-Torre-Syndrom (Honchel et al. 1994) unterschieden.

3.1.3 Wichtige hereditäre Kolonkarzinomsyndrome

3.1.3.1 Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)

Die FAP ist mit einer Inzidenz von 10 pro 100.000 (Bulow et al., 1996) eine seltene Erkrankung. Sie ist gekennzeichnet durch hunderte bis tausende Adenome in Kolon und Rektum, die im Alter von 10-30 Jahren auftreten. Praktisch alle Betroffenen entwickeln fünf bis 15 Jahre nach Adenomentstehung mindestens ein kolorektales Karzinom (obligate Präkanzerose). Dabei korreliert das Entartungsrisiko mit der Polypenanzahl. Der Adenomprogress zum Karzinom ist nicht beschleunigt.

In 80-90% aller FAP-Fälle kann eine Keimbahnmutation in einem Allel des *APC*-Tumorsuppressorgens nachgewiesen werden (Powell et al., 1993), wobei es sich bei bis zu 30% um *de novo* Mutationen ohne familiäre Belastung handelt. Zur Adenomentstehung ist somit nur noch eine somatische Mutation oder Deletion des normalen, zweiten *APC*-Allels in einer teilungsfähigen Darmzelle nötig. Da praktisch alle Nachkommen mit der Keimbahnmutation die Krankheit entwickeln, handelt es sich um einen autosomal dominanten Erbgang mit 100%iger Penetranz (Strate und Syngal, 2005).

Das 1991 identifizierte *APC*-Gen (Grodin et al., 1991) kodiert für ein Protein, das mit β -Cathenin, Axin und der Glycogen-Synthase-Kinase(GSK)-3 β komplexiert. Innerhalb dieses Komplexes wird β -Cathenin phosphoryliert und in der Folge Ubiquitin-vermittelt im Proteasom abgebaut (Rubinfeld et al., 1996). Ein defektes *APC*-Genprodukt führt zu einer gestörten Komplexbildung und einem erhöhten cytoplasmatischen β -Catheninspiegel. Dieses freie β -Cathenin interagiert im Zellkern mit TCF-4, einem Transkriptionsfaktor für verschiedenste Onkogene und sorgt damit für eine vermehrte Transkription dieser proliferationsfördernden Gene (Tetsu und McCormick, 1999).

Die Keimbahnmutationen können in allen 21 Exons des sehr großen *APC*-Gens liegen, bestimmte Genabschnitte und einzelne Kodons sind jedoch besonders häufig betroffen (Beroud und Soussi, 1996). Bezüglich des Schweregrades der Erkrankung besteht dabei eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation (Nagase et al., 1992). Ähnlich der Polyposisausprägung können weitere Manifestationen der Erkrankung wie CHRPE (*congenital hypertrophy of the retinal pigmented epithelium*), Osteome, Desmoidtumore, Epidermoidzysten oder Polypen des oberen Gastrointestinaltraktes Keimbahnmutationen in bestimmten Abschnitten des Gens zugeordnet werden (Wallis et al., 1994). Die erworbenen, somatischen Mutationen liegen zu 60% in der sogenannten *mutation cluster region* zwischen Kodon 1286 und 1513 mit zwei Hotspots in Kodon 1309 und 1450 (Miyoshi, 1992).

Die kleine Gruppe der Patienten mit FAP-Phänotyp, aber ohne nachweisbare *APC*-Mutationen, scheint genetisch heterogen zu sein (Renkonen et al., 2005), wobei die zu Grunde

liegenden Gene bisher nur zum Teil bekannt sind. Seit kurzem ist bekannt, dass auch Mutationen im *MYH*-Gen für einen Teil der FAP-Fälle ohne nachweisbare Keimbahnmutation im *APC*-Gen verantwortlich sind (Sieber et al., 2003; Sampson et al., 2003; Aretz et al., 2006).

3.1.3.2 Attenuierte familiäre adenomatöse Polyposis (AFAP)

Unter einer AFAP versteht man das Auftreten von weniger als 100 Polypen in Kolon und Rektum (Lynch et al., 1995). Das Entstehen der Polypen ist bei diesen Patienten im Vergleich zur FAP um 15 Jahre verzögert, dennoch liegt das Risiko der Betroffenen an Darmkrebs zu erkranken bei über 80% (Jo und Chung, 2005).

Die AFAP kann sowohl durch erworbene Mutationen als auch durch familiär vererbte Keimbahnschäden verursacht sein. In der Mehrzahl der Fälle ist das betroffene Gen unbekannt. Lediglich bei einem relativ geringen Teil der Betroffenen von circa 20% (Varesco, 2004) liegen Keimbahnmutationen im *APC*-Gen vor. Im Unterschied zur klassischen FAP (3.1.3.1.) liegen diese aber außerhalb der bei FAP besonders häufig betroffenen Genabschnitte (Spirio et al., 1993; Hernegger et al., 2002).

Auch die durch Keimbahnmutationen im *MYH*-Gen hervorgerufene MYH-assoziierte Polyposis (Sieber et al., 2003, Gismondi et al., 2004; Aceto et al., 2005; Aretz et al., 2006) präsentiert sich klinisch häufig als AFAP (vergleiche Kapitel 3.3.6).

3.1.3.3 Lynch-Syndrom

Das Lynch-Syndrom oder HNPCC (*hereditary non polyposis colorectal cancer*) ist je nach Untersuchung für 1-6% aller kolorektalen Malignome verantwortlich und stellt die wohl häufigste Form des erblichen Darmkrebses dar (Aaltonen et al., 1998). Charakteristisch ist die Entstehung vorrangig rechtsseitiger kolorektaler Karzinome mit durchschnittlich 45 Jahren, ohne Auftreten multipler Polypen. Zusätzlich treten gehäuft Karzinome des Endometriums, Ovars, Magens sowie weiterer Organe auf. Die Ursache der autosomal dominant vererbten Krankheit liegt im Ausfall eines Gens der *DNA-Mismatch-Reparatur* (MMR), die für die Korrektur postreplikativer Fehler verantwortlich ist. Die Keimbahnmutationen betreffen zumeist die Gene *MSH2* oder *MLH1*, Mutationen in *MSH6*, *PMS1* oder gar *PMS2* werden deutlich seltener beschrieben (Lynch und de la Chapelle, 1999). Nach einem somatischen Verlust des gesunden Allels des betroffenen Reparaturgens sammeln sich nicht korrigierte Replikationsfehler typischerweise in repetitiven Gensequenzen, den Mikrosatelliten, an. Hiervon können auch repetitive Sequenzen proliferationssteuernder Gene betroffen sein.

3.2 Oxidative DNA-Schäden und deren Reparatur

3.2.1 Bildung von 8-oxoG und die Folgen

Freie Sauerstoffradikale (OFR) stellen als Nebenprodukte des aeroben Zellstoffwechsels oder als Folge exogener Einflüsse, wie ionisierender Strahlung oder UV-Licht, eine ständige Gefahr für die Integrität unseres Genoms dar. So wird angenommen, dass jede Zelle täglich dem Angriff von 10^5 Sauerstoffradikalen ausgesetzt ist (Dizdaroglu et al., 2002). Korrelat dieser Genomschädigung ist die Bildung von mehr als 20 unterschiedlichen oxidativ veränderten Purin- und Pyrimidinbasen, von denen die Mehrzahl mutagen wirken kann (Cooke et al., 2003). Daher ist es wichtig, dass die Sauerstoffradikale durch Antioxidantien wie Glutathion oder die Vitamine A, C und E abgefangen werden, bevor potentielle Genomschäden entstehen, welche dann durch komplizierte Reparaturmechanismen beseitigt werden müssen.

Die Hauptquelle reaktiver Sauerstoffformen (ROS) ist die ungewollte Einelektronübertragung auf molekularen Sauerstoff in den Elektronentransportketten der Mitochondrien. Diese betrifft 1-3% des veratmeten Sauerstoffs (Benzi et al., 1992). Das hierbei sowie bei verschiedenen enzymatischen Reaktionen im menschlichen Körper entstehende Superoxid-Anion-Radikal ($O_2^{\cdot -}$) scheint selbst nur schwach reaktiv zu sein. Unter Katalyse durch die Superoxiddismutase entsteht jedoch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches bei Anwesenheit von Metallkationen zu OH^{\cdot} und OH^{\cdot} zerfällt (Lloyd et al., 1997).

Bedeutende Mengen reaktiver Sauerstoffformen werden auch im Rahmen der zellulären Immunantwort freigesetzt. So wird von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen beim *respiratory burst* vorrangig Superoxid freigesetzt (Valko et al., 2004), welches dann mit gleichzeitig entstehendem NO zu Peroxynitrit ($ONO_2^{\cdot -}$) reagiert. Dabei handelt es sich um ein sehr starkes Oxidans, das eine Vielzahl von DNA-Schäden hervorrufen kann (Marnett et al., 2000). Als wichtigste exogene Ursache für die Bildung reaktiven Sauerstoffs wird das Rauchen angesehen (Loft et al., 1992).

Das hochreaktive Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) ist mit seinem ungepaarten Elektron in der Lage mit dem Deoxyribose-Rückgrat der DNA sowie mit Pyrimidin- und Purinbasen zu reagieren. Bei der Reaktion des Hydroxylradikals oder auch von Peroxynitrit ($ONO_2^{\cdot -}$) mit der Purinbase Guanin entsteht zunächst ein C_8 -OH-Adduktradikal, aus dem durch Oxidation die prämutagene Base 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-Oxoguanin; 8-Hydroxyguanin; 8-OH-G; 8-oxoG) wird (Steenken, 1989). Dabei kann die Basenveränderung sowohl in chromosomalen DNA-Strängen als auch in den bei der Replikation verwendeten freien Nukleosidtriphosphaten (GTP) entstehen.

Die Mutagenität der Läsion, die ungefähr eine von 10^5 Guaninbasen betrifft (Grollmann und Moriya, 1993), besteht im Verlust der Spezifität der Basenpaarung, sodass die bei der DNA-Replikation tätigen Polymerasen sowohl Cytidintriphosphat als auch fälschlicherweise Adenosintriphosphat gegenüber 8-oxoG einbauen können (Shibutani et al., 1991). Diese Bereitschaft zur Fehlpaarung beruht in erster Linie darauf, dass die oxidativ geschädigte Base bevorzugt in der energetisch günstigeren *syn*-Konformation (Abb. 2) vorliegt (Oda et al., 1991). Direkte Folge der Basenfehlpaarungen ist das gehäufte Auftreten von G:C→T:A Transversionen in aktiv replizierten Teilen des Genoms. Solche Mutationen konnten bereits in Lungen- und Leberkarzinomen gehäuft nachgewiesen werden (Hollstein et al., 1991).

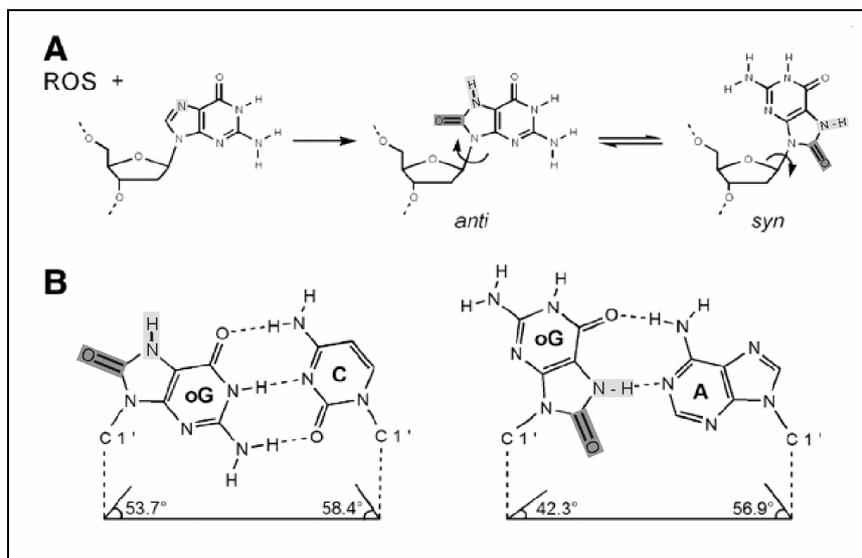


Abbildung 2: 8-oxoG: Struktur und Paarungsverhalten

(modifiziert nach Brieba et al., 2004)

A: 8-oxoG in *syn*- (rechts) und *anti*-Konformation (Mitte) sowie dessen Bildung (links) aus Guanin durch Interaktion mit reaktivem Sauerstoff (ROS)

B: 8-oxoG (oG) in Paarung mit Cytosin (*anti*-Konformation; links) und in Fehlpaarung mit Adenin (*syn*-Konformation; rechts)

3.2.2 Basenexzisionsreparatur (BER)

Nur durch die Existenz mehrerer, teilweise interagierender DNA-Reparaturmechanismen kann die Stabilität der genomischen Information angesichts der Fülle unterschiedlicher Schäden dauerhaft gesichert werden.

Folgeschäden oxidativ veränderter Basen werden hauptsächlich durch die Basenexzisionsreparatur (BER; Abb. 3) verhindert (Jaiswal et al., 1998; Hoeijmakers, 2001). Auch der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) (Reardon et al., 1997) und der Mismatchreparatur (MMR) (Russo et al., 2006) kommt eine gewisse Bedeutung zu. Darüber hinaus wurden auch Interaktionen zwischen diesen verschiedenen Reparaturwegen zur Reparatur oxidativ geschädigter Basen nachgewiesen (Gu et al., 2002).

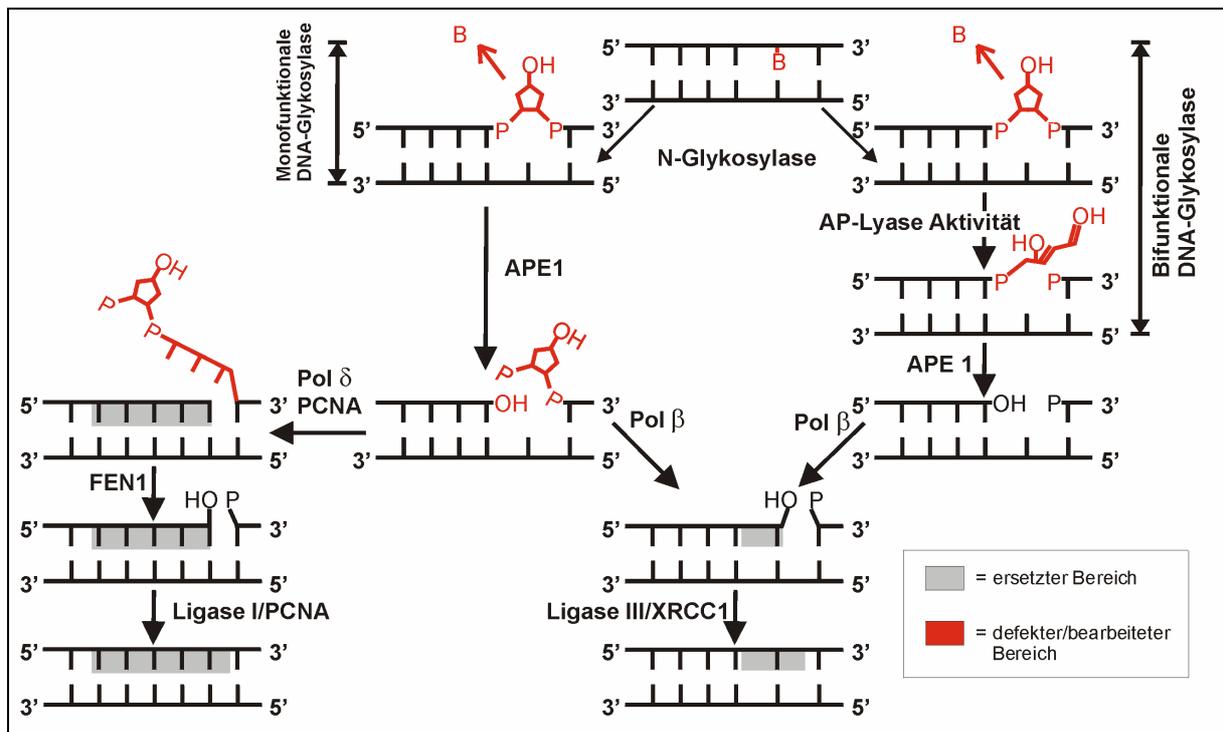


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Abläufe bei der *base excision repair* (BER)

Die defekte Base (B) wird durch eine spezifische Glykosylase entfernt. Das basenlose Nucleotid wird sowohl bei monofunktionalen (oben links) als auch bei bifunktionalen (oben rechts) Glykosylasen, die zusätzlich eine intrinsische AP-Lyase Aktivität besitzen, mit Hilfe von APE1 und einer DNA-Polymerase entfernt. Im Falle der *short patch* (SP) BER (unten rechts) wird die entstandene Lücke durch die Polymerase β aufgefüllt. Bei der *long patch* (LP) BER (unten links) werden mehrere Nucleotide durch die Polymerase δ entfernt und ersetzt.

Je nach Basenschaden wird bei der BER zunächst durch eine auf diese Läsion spezialisierte DNA-Glykosylase die betreffende Base mittels Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung entfernt. Dabei erkennt jede Glykosylase nur einige bestimmte geschädigte oder fehlgepaarte Basen. Die entstandene basenfreie Lücke kann dann von APE1 (*apurinic/aprimidinic endonuclease*) erkannt werden, welche die Phosphodiesterbindung 5' der entfernten Base löst, sodass ein 3'-OH und ein 5'-Deoxyribosephosphat entstehen. Im nächsten Schritt kann die DNA-Polymerase β diesen Zuckerphosphatrest entfernen und gleichzeitig ein neues Nucleotid am OH-Ende befestigen. Zuletzt wird die entstandene Lücke durch einen Komplex aus DNA-Ligase 3 und XRCC1 (*X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 1*) endgültig verschlossen (Kubota et al., 1996).

Bifunktionelle Glykosylasen besitzen zusätzlich eine intrinsische AP-Lyase-Aktivität (*apurinic/aprimidinic lyase activity*), mit der diese außerdem in der Lage sind selbst Phosphodiesterbindungen zu lösen. Mit Hilfe von APE1 wird auch hierbei das basenlose Nucleotid entfernt und dann durch die Polymerase β ersetzt (Ide und Kotera, 2004). Alternativ zu diesem als *short patch*-BER (SP-BER) bezeichneten Weg wird je nach Läsion von bestimmten Glykosylasen auch die sogenannte *long patch*-BER (LP-BER) initiiert (Fortini et al., 1999). Hierbei wird unter Beteiligung der DNA-Polymerase δ oder ε, *flap*

endonuclease 1 (FEN1) und DNA-Ligase1 ein zwei bis 13 Nukleotide langes DNA-Stück mit der geschädigten Base entfernt. Die Anwesenheit von PCNA (*proliferating cellular nuclear antigen*) und RPA (*replication protein A*) bei der LP-BER legt nahe, dass dieser Weg räumlich und funktionell eng an die DNA-Replikation gekoppelt sein muss (Fan und Wilson, 2005).

3.2.3 Reparatur 8-oxoG bedingter Schäden

Aufgrund der Gefährdung fast aller Organismen durch die ständige Bildung von 8-oxoG haben nahezu alle Lebewesen ein spezifisches System zur Beseitigung der geschädigten Base selbst und zur Verhinderung von Folgeschäden entwickelt. Dieses sogenannte *GO-System* (Abb. 4), welches ursprünglich bei *E.coli* entdeckt wurde, besteht aus drei Enzymen, die gemeinsam an der Beseitigung oxidativer Schäden beteiligt sind (Michaels and Miller 1992). Dabei muss zwischen zwei verschiedenen Schädigungsmechanismen unterschieden werden: Wird bei der Replikation frei im Nukleotidpool der Zelle vorkommendes 8-oxodGTP gegenüber von Adenin im DNA-Doppelstrang eingebaut, so führt der eigentlich richtige Einbau von dCTP gegenüber von 8-oxodG im nächsten Replikationsschritt zu A:T→C:G Transversionen (Abb. 4B). Diese werden bei *E.coli* durch das Enzym MutT verhindert, welches durch Hydrolyse von 8-oxodGTP zu 8-oxodGMP dessen Einbau bei der Replikation vermindern kann (Maki and Sekiguchi, 1992). Eine Inaktivierung des entsprechenden *MutT*-Gens führt zu einem gehäuften Auftreten von A:T→C:G Mutationen (Yanofsky et al., 1966). Daneben benötigt die Bakterienzelle im Falle einer 8-oxoG-Bildung innerhalb chromosomaler DNA die Glykosylasen MutM und MutY, um durch Basenexzisionsreparatur G:C→T:A Transversionen zu verhindern (Abb. 4A). MutM entfernt 8-oxoG aus dem DNA-Strang, sodass dies dann durch unverändertes Guanin ersetzt werden kann (Tchou et al., 1991). Misslingt jedoch die Entfernung von 8-oxoG, was bei 0,2 bis 0,6% der Schäden der Fall ist (Loft und Poulsen, 1996), so muss zumindest dafür gesorgt werden, dass die bei der Replikation dieses schadhafte DNA-Doppelstranges entstehenden Tochterstränge keine Fehler aufweisen. Deshalb löst MutY das eigentlich unbeschädigte, aber mit 8-oxoG fehlgepaarte Adenin aus dem DNA-Tochterstrang, damit die DNA-Polymerase dieses durch Cytosin ersetzen kann (Tsai-Wu et al., 1992). Wird aufgrund der Struktur von 8-oxoG wieder Adenin eingesetzt, so wird erneut durch MutY die Basenexzisionsreparatur initiiert. Die Bedeutung dieser beiden Glykosylasen wird durch die Entwicklung eines Mutatorphänotyps mit G:C→T:A Transversionen schon beim Ausfall von MutM (Cabrera et al., 1988) oder MutY (Nghiem et al., 1988) in *E.coli* deutlich. Die humanen Homologe von MutT, MutM und MutY, welche weitgehend die gleichen Aufgaben wie die bakteriellen Enzyme erfüllen,

werden als MTH1 (Sakumi et al., 1993), OGG1 (Roldan-Arjona et al., 1997) und MYH (Slupska et al., 1996) bezeichnet.

Entscheidend für die korrekte Reparatur ist, dass fehlgepaartes Adenin nur aus neu replizierten Tochtersträngen entfernt wird. Bei Entfernung von Adenin aus einem A:8-oxoG Basenpaar, das durch Einfügen eines 8-oxoG-haltigen Nukleotids gegenüber von regulärem Adenin eines DNA-Mutterstranges entstanden ist, würde MYH eventuell A:T→C:G Mutationen verursachen. Das menschliche MutY-Homolog (MYH) scheint im Rahmen der sogenannten *replication-coupled-repair* (Boldogh et al., 2001) spezifisch für Tochterstränge zu sein (Hazra et al., 1998). Die Tatsache, dass *MYH* die LP-BER bevorzugt (Hashimoto et al., 2004) und dabei mit an der Replikation beteiligten Faktoren wie PCNA interagiert (Parker et al., 2001), könnte diese Spezifität erklären.

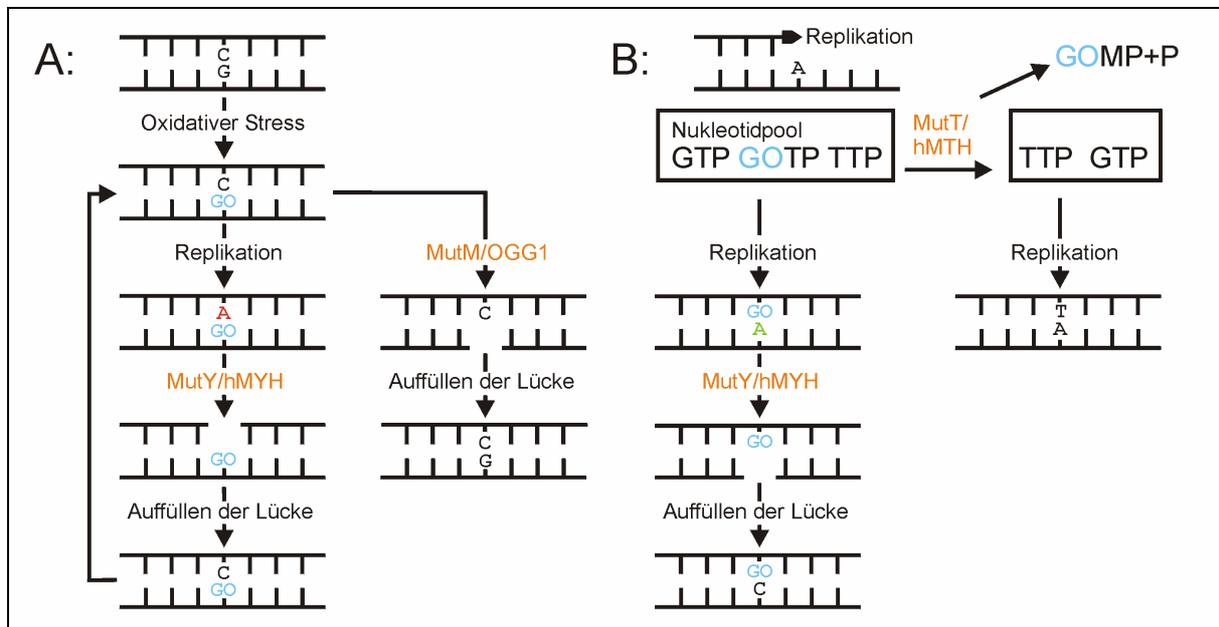


Abbildung 4: Funktionsweise des GO-Systems bei der DNA-Reparatur

A: Reparaturvorgänge bei Schädigung genomischer Basen. Durch oxidativen Stress entsteht 8-oxoG (blau). Bei einer nachfolgenden DNA-Replikation kommt es zur Fehlpaarung mit Adenin (rot). MutY entfernt das fehlgepaarte Adenin (linke Spalte) und verhindert damit die Entstehung einer G:C→T:A Transversion. MutM kann die geschädigte Base (GO) selbst entfernen (rechte Spalte) bevor es in einer nachfolgenden Replikation zur Fehlpaarung kommt.

B: Vorgänge beim Einbau defekter Nukleotide im Zuge der Replikation. MutT entfernt das defekte Nukleotid (GOTP) aus dem Pool der Zelle, sodass nicht 8-oxoG (GO; blau) sondern regulär Thymin gegenüber von Adenin eingebaut wird (rechte Spalte). Kommt es trotzdem einmal zum Einbau von 8-oxo-G (linke Spalte) gegenüber von Adenin darf das template Adenin (grün) nicht durch MutY entfernt werden, da sonst A:T→C:G Mutationen entstehen. Die menschlichen Homologe MYH, OGG1 und MTH (orange) übernehmen die gleichen Aufgaben wie die entsprechenden bakteriellen Enzyme MutY, MutM und MutT.

3.2.4 Oxidativer Stress bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

3.2.4.1 Einteilung und Epidemiologie

Im Allgemeinen werden die Colitis ulcerosa mit einer Inzidenz von 10,4/100000 (Shivananda et al., 1996) und der Morbus Crohn mit einer Inzidenz von 5,6/100000 (Shivananda et al., 1996) aufgrund ihrer klinischen Gemeinsamkeiten unter dem Oberbegriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) zusammengefasst. Bei beiden Krankheiten findet sich ein dichtes entzündliches Infiltrat in der Schleimhaut, welches vorwiegend aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten besteht (McKenzie et al., 1996). Bei der Colitis ulcerosa ist die Entzündung auf die Mukosa beschränkt und betrifft kontinuierlich vom Rektum beginnend das Kolon. Dagegen handelt es sich beim Morbus Crohn um eine alle Wandschichten betreffende Entzündung, die den gesamten Gastrointestinaltrakt diskontinuierlich befallen kann.

3.2.4.2 Maligne Tumore bei chronisch entzündlicher Darmerkrankung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen gelten als Risikofaktor für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms. Während bei der Colitis ulcerosa abhängig von der Erkrankungsdauer ein bis zu 20-fach erhöhtes Risiko bekannt ist (Askling et al., 2001), gibt es beim Morbus Crohn widersprüchliche Ergebnisse (Munkholm et al., 1993; Persson et al., 1994; Bernstein et al., 2001). Aufgrund großer Metaanalysen geht man heute von einem ungefähr verdoppelten Kolonkarzinomrisiko und einem 27-fach erhöhten Risiko für Karzinome des Dünndarms aus (Jess et al., 2005).

Da vor allem Patienten mit einer ausgedehnten, floriden und lange bestehenden Entzündung betroffen sind (Gillen et al. 1994), wird vermutet, dass unter anderem die Entzündungskaskade selbst für die Karzinomentstehung mitverantwortlich ist (Itzkowitz 2002).

Adenome kommen als gutartige Vorstufen maligner Tumore bei eher jüngeren Patienten mit CED nur sporadisch vor (Dixon et al., 2006). Die mit CED assoziierten Karzinome entstehen meist aus nichtpolypösen, teilweise multifokalen, dysplastischen Vorläuferläsionen über eine sogenannte Inflammation-Dysplasie-Karzinom-Sequenz (Itzkowitz und Yio, 2004). Dabei ist es erstaunlich, dass mit *APC*, *K-ras*, *p53* oder *DCC* zwar die gleichen Gene wie bei sporadischen Kolonkarzinomen, jedoch mit anderer Häufigkeitsverteilung mutiert sind. Anders als bei den sporadischen Fällen werden *p53*-Mutationen bei CED-assoziierten Karzinomen relativ früh und *APC*-Mutationen erst spät im Verlauf der Sequenz beobachtet. Entsprechend lassen sich in niedrig- bis hochgradig dysplastischem Gewebe kaum *APC*-Mutationen nachweisen, während bei Kolitis-assoziiertem kolorektalem Karzinom immerhin

in bis zu 14% der Fälle Mutationen im *APC*-Gen auftreten (Redston et al., 1995; Aust et al., 2002). Dagegen sind *p53* Mutationen in bis zu 80% der Karzinome, in 30% der Dysplasien und bei 6% der Fälle in entzündeter, nichtdysplastischer Schleimhaut nachweisbar (Burmer et al., 1992).

Neueren Theorien zufolge dürfte der die chronische Entzündung begleitende oxidative Stress besonders zur neoplastischen Transformation beitragen (Hussain et al., 2002). Über bei der Entzündung freigesetzte Faktoren wie NFκB kommt es in den betroffenen Kolonzellen zu einer vermehrten Bildung von induzierbaren NO-Synthetasen (iNOS) (Singer et al., 1996). Neben den von Entzündungszellen freigesetzten Sauerstoffradikalen reagiert auch das dann im entzündeten Gewebe vermehrt entstehende NO über Peroxynitrit mit der DNA (2.2.1.). Die daraus resultierenden Basenläsionen, insbesondere 8-oxodG, sind so auch bei Patienten mit CED häufiger zu beobachten (D’Inca et al., 2004).

3.3 Die DNA-Glykosylase MYH

3.3.1 Das *MYH*-Gen und seine Genprodukte

Das humane *MYH*-Gen ist 7,1 kb lang und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 zwischen p32.1 und p34.3. Dabei sind 41% der Basen des *MYH*-Gens identisch mit denjenigen von *MutY*, dem entsprechenden Gen bei *E.coli* (Slupska et al., 1996).

Ursprünglich konnten 16 Exons identifiziert werden, die zwischen 35 und 132 bp groß sind und von 15 Introns unterbrochen werden (Abb. 5). Diese besitzen eine Länge von 75 bis annähernd 1900 Basen (Slupska et al., 1996). Inzwischen konnten vier verschiedene Formen von Exon 3 (Spleißvarianten) sowie drei grundsätzlich unterschiedliche erste Exons nachgewiesen werden (Ohtsubo et al., 2000).

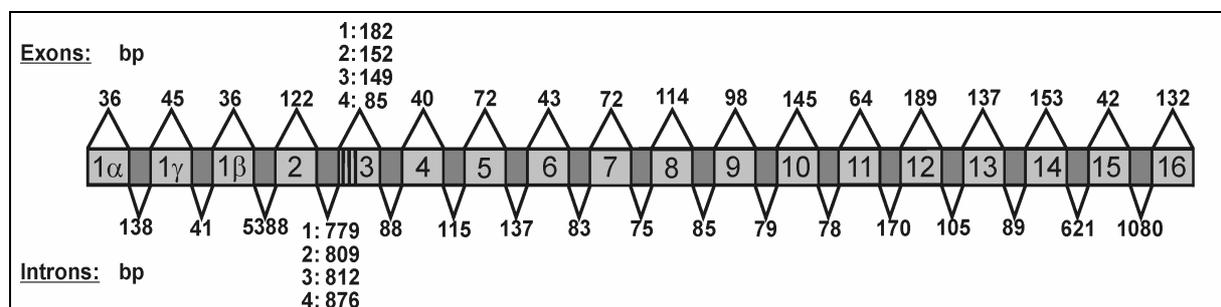


Abbildung 5: Genstruktur von *MYH* und bp-Länge von Exons und Introns

Es existieren vier vorbeschriebene Spleißvarianten von Exon 3. Daher sind je nach Spleißvariante (1-4) vier verschiedene Längen für Exon 3 und Intron 2 angegeben. Es sind drei verschiedene Transkriptionsstartpunkte und somit erste Exons (1 α , β , γ) beschrieben.

Das *MYH*-Gen scheint für eine Vielzahl verschiedener Formen der MYH-Glykosylase zu kodieren. Grund für die Entstehung mehrerer Genprodukte aus dem *MYH*-Gen ist die Bildung von drei verschiedenen Transkripten (α , β und γ) mit unterschiedlichem Transkriptionsstartpunkt. Durch alternatives Spleißen entstehen mindestens zehn mRNAs, wobei deren Translation wiederum an mehreren Startkodons beginnen kann (Ohtsubo et al., 2000).

Während das MYH-Protein zunächst nur in Mitochondrien nachgewiesen werden konnte (Takao et al., 1998), gelang es kurz darauf auch eine nukleäre Form zu identifizieren. Diese wurde als Typ2-Protein bezeichnet und unterscheidet sich von der mitochondrialen Typ1-Form durch das Fehlen von 14 N-terminalen Aminosäuren. Diese Sequenz soll als *mitochondrial targeting signal* für den Transport des Proteins in die Mitochondrien verantwortlich sein (Takao et al., 1999). Allerdings konnte das Typ1-Protein mittlerweile auch im Zellkern nachgewiesen werden (Tsai-Wu et al., 2000). Die α -Transkripte sollen dem Typ1-Protein, die β -Transkripte dem Typ2-Protein entsprechen (Ohtsubo et al., 2000). Weitgehend unklar bleibt, welche Unterschiede zwischen den verschiedenen Proteinen bestehen, die den alternativ gespleißten Transkripten entsprechen.

3.3.2 Substrate der Glykosylase MYH

Neben der Fähigkeit, Adenin aus A:8-oxoG-Paaren zu entfernen (Takao et al., 1999), kann die menschliche MYH-Glykosylase auch in geringerem Maße Adenin aus A:G Paaren lösen (Slupska et al., 1999). Zusätzlich scheint auch die durch oxidative Veränderung von Adenin entstehende Base 2-Hydroxyadenin (2-OH-A) in Fehlpaarung mit Cytosin Substrat von MYH zu sein (Ohtsubo et al., 2000). Neueren Beobachtungen zufolge ist anzunehmen, dass es sich bei MYH wie auch bei MutY um eine monofunktionelle Glykosylase mit, wenn überhaupt, minimaler AP-Lyase Aktivität handelt (Slupska et al., 1999; Shinmura et al., 2000). MYH scheint vorrangig die LP-BER zu initiieren (siehe auch 3.2.2 und 3.2.3).

3.3.3 Funktionelle Domänen und Biochemie

Schwierigkeiten bei der Expression und Isolation von MYH sind dafür verantwortlich, dass kaum verlässliche Daten über dessen Reparaturfunktion vorliegen. Vielmehr wird das gut untersuchte *E.coli* MutY-Protein wegen seiner Homologie als verlässliches Modell herangezogen. Die N-terminale Domäne enthält die katalytische Region (Manuel und Lloyd, 1999) und teilt charakteristische Motive wie *helix-hairpin-helix* (HhH), pseudo-HhH oder ein Eisen-Schwefel-Zentrum mit anderen BER-Glykosylasen (Guan et al., 1998). Die C-terminale Domäne ist dagegen kein typisches Strukturmerkmal der BER-Glykosylasen, weist aber große Übereinstimmungen mit MutT auf. Dies spricht für eine wichtige Rolle dieser Domäne bei der Substraterkennung, speziell von 8-oxoG:A Basenpaaren (Noll et al., 1999; Chmiel et al. 2001). Nach Erkennen eines fehlgepaarten Adenins wird dieses über Rotation und Kompression der umgebenden Phosphodiesterbindungen durch spezielle Motive der Glykosylase in eine extrahelikale Position gebracht. Die Bindung des Adenins in einer speziellen Tasche auf der Oberfläche von MutY ermöglicht dann die Entfernung des fehlgepaarten Adenins durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung (Guan et al., 1998).

3.3.4 Kolonpolypen bei Keimbahnmutationen in MYH

Für die meisten DNA-Reparaturmechanismen ist bereits seit einigen Jahren bekannt, dass ihre Inaktivierung zur Entstehung jeweils spezifischer Malignome prädisponiert. Der BER konnte dagegen lange Zeit kein Tumorsyndrom zugeordnet werden. Als Grund hierfür wurden die überlappenden Substratspezifitäten der beteiligten Glykosylasen vermutet, sodass der Ausfall der einen durch eine andere kompensiert werden kann (Hazra et al., 2003).

Im Jahr 2002 konnte jedoch zufällig bei drei Geschwistern mit multiplen kolorektalen Adenomen und Karzinomen im Tumorgewebe eine Häufung von G:C→T:A Mutationen im *APC*-Gen festgestellt werden. Weder eine Mikrosatelliteninstabilität als Hinweis auf ein

HNPCC noch Keimbahnmutationen im *APC*-Gen konnten identifiziert werden. Das ungewöhnliche Muster der somatischen *APC*-Mutationen wies allerdings auf einen potentiellen Defekt im System zur Korrektur oxidativer Schäden hin. Es wurden daher die kodierenden Bereiche von *OGG1*, *MTH1* und *MYH* untersucht.

Tatsächlich waren alle drei betroffenen Geschwister compound heterozygot für zwei *MYH*-Keimbahnmutationen, pY165C (c494 A>G) und pG382D (c1145G>A) (Al-Tassan et al., 2002). Während das eine Allel durch eine der beiden Mutationen inaktiviert wird, ist das zweite von der anderen Mutation betroffen. Diese Konstellation führt zu einer deutlich verringerten Aktivität der Glykosylase mit einem Exzess von G:C→T:A Mutationen in wichtigen Tumorsuppressorgenen, der die Entstehung von kolorektalen Adenomen und Karzinomen begünstigt.

Vier weitere Geschwister der Erkrankten (Abb. 6) wiesen entweder keine *MYH*-Mutation auf oder waren lediglich für eine der beiden Varianten heterozygot. Diese vier Geschwister, die Eltern und sämtliche Kinder der drei Patienten mit multiplen Adenomen zeigten keine Darmveränderungen. Dieses Muster (Abb. 6) ließ einen autosomal-rezessiven Erbgang für diese Form der Polyposis vermuten (Al-Tassan et al., 2002).

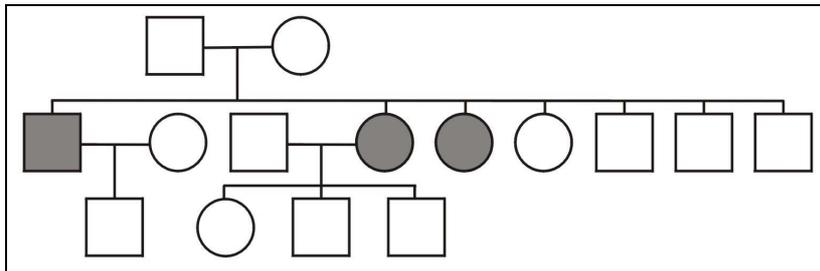


Abbildung 6: Stammbaum der Familie N. (nach Al-Tassan et al., 2002)
Drei der sieben Geschwister (dunkelgraue Symbole) wiesen biallelische *MYH*-Inaktivierungen auf und zeigten multiple Adenome. Rechtecke symbolisieren Männer, Frauen sind als Kreise dargestellt.

In einer nachfolgenden Studie wurde bei sechs von 21 Patienten mit multiplen kolorektalen Adenomen, mit oder ohne daraus entstandenem Karzinom, ebenfalls eine biallelische Inaktivierung von *MYH* durch teilweise unbekannte Keimbahnmutationen beschrieben (Jones et al., 2002). Die Tatsachen, dass 98% der somatischen Mutationen im *APC*-Gen der Adenome wiederum G:C→T:A Mutationen waren, und dass weder die potenziell heterozygoten Kinder oder Eltern erkrankt waren, führte zu der Annahme, dass das von Al-Tassan beschriebene Krankheitsbild kein Einzelfall war. Vielmehr schien diese *MYH*-assoziierte-Polyposis (MAP; Sieber et al., 2003), welche bei Ausfall beider *MYH*-Kopien in der Keimbahn entsteht, einen noch nicht genauer abgrenzbaren Teil der *APC*-negativen familiären Polyposis mit eher milder Klinik zu erklären.

Veränderungen in *OGGI* oder *MTH1* konnten bisher nicht bei Patienten mit entsprechender Klinik identifiziert werden (Al-Tassan et al., 2002; Jones et al., 2002; Sieber et al., 2003).

3.3.5 MYH-Genvarianten

Seit der Entdeckung zweier Mutationen im *MYH*-Gen durch Al-Tassan im Jahre 2002 wurden weitere Keimbahnvarianten (siehe Tab. 30-32) in verschiedensten Bereichen des Gens beschrieben. Die genaue Bedeutung dieser Varianten für die Glykosylaseaktivität des entsprechenden Proteins ist jedoch meist unklar. Die Pathogenität kann oft nur indirekt durch Analyse des resultierenden Phänotyps, der Lage der Mutation in funktionell wichtigen Regionen oder der Konserviertheit der ausgetauschten Aminosäure abgeschätzt werden. Neben Missense-Mutationen mit Austausch einer Aminosäure oder der Insertion einer Aminosäure wurden auch Mutationen gefunden, welche zu einem Stopkodon und daraus resultierender Bildung eines verkürzten Proteins führen. Schwieriger zu beurteilen sind dagegen seltener beschriebene Varianten im Intronbereich, die möglicherweise das Spleißen der mRNA beeinflussen können. Die beiden von Al-Tassan beschriebenen Formen Y165C und G382D scheinen in der kaukasischen Rasse mit weitem Abstand am häufigsten zu sein und 53% beziehungsweise 32% der Mutationen auszumachen (Cheadle und Sampson, 2003). Beide führen zur Reduktion der Glykosylaseaktivität auf unter 10% und sind somit sicher als pathogen einzustufen (Al-Tassan et al., 2002; Chmiel et al., 2003). In bestimmten Regionen der Erde kann neben diesen beiden Hotspotmutationen jeweils eine weitere, sonst kaum vorhandene, Mutation mit hoher Frequenz beobachtet werden. Dagegen scheinen die bei uns dominierenden Mutationen Y165C und G382D in anderen Rassen keine Rolle zu spielen (Kim et al., 2004; Miyaki et al., 2005; Kim et al., 2007).

Von den relativ seltenen Mutationen mit nachgewiesener oder wahrscheinlicher Pathogenität müssen *MYH*-Varianten mit unklarer Pathogenität unterschieden werden. Diese weisen meist eine größere Allelhäufigkeit auf und sind oft bei gesunden Individuen ähnlich häufig wie bei Polyposispatienten (Sieber et al., 2003; Fleischmann et al., 2004; Isidro et al., 2004). Die Mehrzahl davon liegt in Genabschnitten deren genaue Bedeutung noch nicht bekannt ist oder in Introns. Bislang ist aufgrund weitgehend fehlender Untersuchungen unklar, ob beziehungsweise wie stark einzelne dieser Varianten die Aktivität der Glykosylase beeinträchtigen können (Alhopuro et al., 2005).

3.3.6 Phänotyp bei biallelischer MYH-Inaktivierung

Die bei der MYH-assoziierten-Polyposis (MAP) entstehenden Adenome scheinen ohne deutliche Bevorzugung einer bestimmten Lokalisation auf Kolon und Rektum verteilt zu sein und sich auch in ihrer Histologie nicht von sporadischen oder im Rahmen anderer Polyposissyndrome entstehender Adenome zu unterscheiden. Allein die Anzahl der Adenome kann nach gegenwärtiger Vorstellung einen Hinweis auf *MYH*-Keimbahnmutationen als Ursache der Polyposis geben (Sieber et al., 2003). So werden biallelische *MYH*-Inaktivierungen zumeist bei einem Phänotyp gefunden, der mit der AFAP (10-100 Adenome) oder milden FAP (bis 1000 Adenome) vergleichbar ist (Venesio et al., 2004; Gismondi et al., 2004; Aceto et al., 2005; Nielsen et al., 2005). Unabhängig vom Ausmaß der Polyposis weisen alle Patienten mit MAP ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms auf (Sieber et al., 2003).

Allgemein kann eine große Variabilität des Phänotyps bei biallelischer *MYH*-Inaktivierung beobachtet werden (Baglioni et al., 2004). Eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist bisher nicht sicher nachgewiesen (Raouf et al., 2007). So wurden auch gelegentlich bei jungen Patienten mit kolorektalem Karzinom und nur wenigen begleitenden Adenomen biallelische *MYH*-Keimbahnmutationen identifiziert (Wang et al., 2004; Croitoru et al., 2004). Bei den meisten Patienten kann jedoch das Bild der MYH-assoziierten Polyposis mit 10-1000 Adenomen in Kolon und Rektum diagnostiziert werden. Unter gesunden Kontrollpersonen konnte bis heute noch kein Träger von homozygoten oder compound heterozygoten *MYH*-Mutationen gefunden werden, was für eine hohe Penetranz des autosomal-rezessiven Erbgangs spricht.

Die für die FAP typischen extrakolonischen Manifestationen wie CHRPE (*congenital hypertrophy of the retinal pigmented epithelium*), Osteome und Dermoidzysten können auch bei der MAP, in der Regel aber deutlich seltener als bei der klassischen FAP, auftreten (Sieber et al., 2003; Sampson et al., 2003; Gismondi et al., 2004; Gammon 2007). Neubildungen des oberen Gastrointestinaltraktes wie Duodenaladenome oder harmlose Magenfundusdrüsen-Polypen wurden sogar bei bis zu einem Drittel der MAP-Patienten identifiziert (Nielsen et al., 2005).

3.3.7 Karzinogenese bei biallelischer MYH-Inaktivierung

Die Entstehung kolorektaler Adenome bei der MAP weist nach heutiger Vorstellung deutliche Überschneidungen mit der Abfolge genetischer Alterationen bei der Entstehung sporadischer Adenome und Karzinome auf. So führen die biallelischen *MYH*-Inaktivierungen über oxidative DNA-Schäden bevorzugt zu einem Anstieg von G:C→T:A-Transversionen im *APC*-Gen und im *K-ras2*-Gen, die beide eine wichtige Rolle im Prozess der kolorektalen Karzinogenese spielen. Eine Mikrosatelliteninstabilität wird dagegen nicht beobachtet (Lipton et al., 2003). Im Tiermodell ist bei Mäusen mit biallelisch inaktiviertem *MYH*-Gen eine zusätzliche heterozygote *APC*-Keimbahnmutation nötig, um multiple Adenome im Dünndarm, jedoch nicht im Kolon der Tiere zu provozieren. Dagegen werden beim Menschen beide *APC*-Kopien in Folge der *MYH*-Defizienz ausgeschaltet (Sieber et al., 2004). Ursache hierfür soll der im Vergleich zu Labormäusen höhere oxidative Stress im menschlichen Darm sein.

Die Lokalisation der G:C→T:A-Mutationen im *APC*-Gen ist dabei nicht zufällig. Vielmehr entstehen die Transversionen signifikant häufiger im Kontext zweier Adeninbasen unmittelbar 3' des oxidativ geschädigten Guanins (Al-Tassan et al., 2002; Jones et al., 2002). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte die dreifach geringere Glykosylaseaktivität des *MYH*-Wildtyps für GAA-Sequenzen im Vergleich zu anderen Sequenzen darstellen (Chmiel et al., 2003).

Die Mutationen im *K-ras2*-Gen sind scheinbar ausschließlich GGT→TGT Mutationen in Kodon 12 (Halford et al., 2003; Lipton et al., 2003). Man muss also davon ausgehen, dass mehrere Faktoren, wie die umgebende Sequenz oder auch bisher unentdeckte Mechanismen, die Häufigkeit einer Mutation an einer bestimmten Stelle eines Genes bei *MYH*-Ausfall mitbestimmen. Im Vergleich zu Genen, welche an der Entstehung von Karzinomen der Mamma, Lunge, Nieren oder anderen Organen beteiligt sind, weist das *APC*-Gen mit 216 GAA-Basenfolgen deutlich mehr dieser Basen-Sequenzen auf. Dies könnte erklären, warum im Gegensatz zum HNPCC bisher ausschließlich Darmtumore sichere Folge biallelischer *MYH*-Keimbahnmutationen sind (Cheadle und Sampson, 2003, Barnetson et al., 2007; Beiner et al., 2008). Ein weiterer Faktor könnte die im Vergleich zu anderen Organen große Anzahl oxidativer Schäden im Darm darstellen (Babbs, 1990).

Konsequente Mutationen im *p53*-Gen sind wohl auch bei *MYH*-assoziierten Karzinomen für die maligne Entartung der durch *APC* oder *K-ras2*-Mutationen entstandenen Adenome mitverantwortlich. Ein gehäuftes Auftreten von G:C→T:A Transversionen in *p53* konnte bisher nicht beobachtet werden (Lipton et al., 2003).

3.3.8 Monoallelische MYH-Keimbahnmutationen und ihre Folgen

Die Ergebnisse mehrerer Studien lassen ein erhöhtes Kolonkarzinomrisiko für Personen mit einer einzigen heterozygoten *MYH*-Keimbahnmutation vermuten ohne statistisch signifikante Ergebnisse zu liefern (Sieber et al., 2003; Wang et al., 2004; Croitoru et al., 2004; Fleischmann et al., 2004; Olschwang et al., 2007). In einer Metaanalyse konnte allerdings ein signifikant erhöhtes Karzinomrisiko (1,4-fach; $p=0,035$) für Träger monoallelischer *MYH*-Mutationen errechnet werden (Jenkins et al., 2006). Die Mehrzahl dieser Karzinome wurde in einem Alter von über 60 Jahren und somit nicht früher als sporadisch auftretende Karzinome diagnostiziert (Kambara et al., 2004). Der genaue molekulare Mechanismus der Entstehung dieser Neoplasien ist jedoch unklar. Als mögliche Ursache wird der Verlust des *MYH*-Wildtypallels im Tumorgewebe im Sinne eines 1pLOH (*loss of heterozygosity*) diskutiert (Sieber et al., 2003; Kambara et al., 2004). Auch muss die Möglichkeit, dass monoallelische *MYH*-Keimbahnmutationen folgenlos neben der eigentlichen Ursache der Karzinome bestehen könnten, bedacht werden (Halford et al., 2003).

Neben dem unklaren Karzinomrisiko wird auch ein erhöhtes Polyposisrisiko für Träger einer einzigen heterozygoten *MYH*-Keimbahnmutation diskutiert (Wang et al., 2004; Aceto et al., 2005).

3.4 Vom Gen zum Protein

Bei der Transkription wird durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase innerhalb des Zellkerns eine einzelsträngige RNA-Kopie eines Gens hergestellt. Für die Regulation dieses Vorganges und das Auffinden des Startpunktes der Transkription, die bei manchen Genen an verschiedenen Stellen beginnen kann, sind bestimmte Basenabfolgen, sogenannte Promotoren (z.B. TATA-Box, BRE-Element und CAAT-Box) in der Umgebung der Startpunkte notwendig. Erst durch komplexe posttranskriptionale Modifikation der ursprünglichen Transkripte werden diese funktionstüchtig und können im Cytosol in eine Abfolge von Aminosäuren umgesetzt, also translatiert, werden. Eine Fehlregulation dieser komplexen Vorgänge kann durch Bildung nicht funktionsfähiger Proteine die Entstehung von Krankheiten, möglicherweise auch der MAP, bedingen.

3.4.1 Prä-mRNA-Spleißen

Im Jahre 1977 wurde entdeckt, dass die Gene eukaryoter Organismen diskontinuierlich auf der DNA angeordnet sind (Berget et al., 1977). Für Proteine kodierende Bereiche, die sogenannten Exons, werden von meist vielfach längeren nicht-kodierenden Sequenzen, den Introns, unterbrochen. Dabei sind die Exons durch kurze Sequenzen an den Exon-Intron-Grenzen, den 3'- und 5'- Spleißstellen, definiert. Bei der posttranslationalen Modifikation der primären Transkripte müssen die den Introns entsprechenden Bereiche aus der Prä-mRNA entfernt werden, ohne dass dabei kodierende Bereiche verloren gehen. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet und von einem Komplex aus fünf kleinen nukleären Ribonukleoproteinen (*snRNPs*; U1, U2, U4, U5, U6) und über 100 Proteinen, dem Spleißosom, durchgeführt (Burge, 1999).

Die Exongrenzen sind durch die klassischen intronischen 3'- und 5'-Spleißstellen mit typischer Basenabfolge gekennzeichnet (Abb. 7). Die 5'-Spleißstelle ist in 95-99% der Fälle durch ein GT-Dinukleotid gekennzeichnet, während die 3'-Spleißstelle fast immer ein AG aufweist (Burset et al., 2000). Diese beiden wenig variablen Dinukleotide werden jeweils von Basenabfolgen umrahmt, die nicht immer in absolut identischer Form vorliegen. An vermeintlichen Schlüsselpositionen sind allerdings meist die gleichen Basen zu finden (Zhang, 1998). Der 3'-Spleißstelle geht zumeist eine pyrimidinreiche Region unmittelbar voraus. Weitere 15-30 Basenpaare davor liegt die immer ähnlich aufgebaute Verzweigungsstelle (*branch point*), die durch ein Adenin an fester Position gekennzeichnet ist (Zhang, 1998).

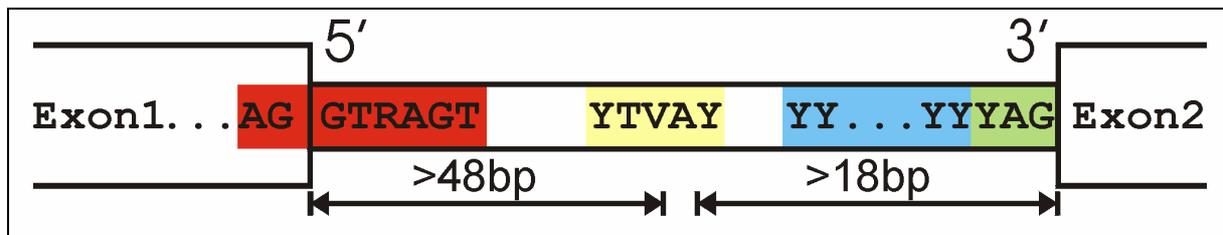


Abbildung 7: Wichtige Spleißsignale im Intron

Rot dargestellt ist die 5'-Spleißstelle, gelb hinterlegt ist der *branch point*. Der grün markierten 3'-Spleißstelle geht ein Polypyrimidintrakt (blau) unmittelbar voraus. Die Mindestabstände zwischen 3'- und 5'-Spleißstelle und dem A des *branch points* sind durch Doppelpfeile markiert.

A=Adenin; G=Guanin; T=Thymin; R=Purin; Y=Pyrimidin; V= Adenin, Guanin, Cytosin

Da den tatsächlichen Spleißstellen sehr ähnliche Sequenzen relativ häufig im Genom vorkommen (Sun und Chasin, 2000), kann die Erkennung einer spleißstellentypischen Sequenz nur einen Teil der Information ausmachen, die dann endgültig zum Spleißen an dieser Stelle führt (Lim und Burge, 2001). Zusätzlich zu den klassischen Spleißstellen sollen daher bestimmte Basenabfolgen, die sogenannten *cis-regulatory elements*, als Erkennungssequenz für verschiedene Proteine dienen, die dann als *trans-acting factors* mit dem Spleißosom interagieren und ein Spleißen an dieser Stelle fördern oder verhindern (Manitas und Tasic, 2002; Black, 2003). Fördernde Elemente werden je nach ihrer Lage als exonische oder intronische Spleiß-Enhancer bezeichnet (ESE: *exonic splice enhancer*; ISE: *intrinsic splice enhancer*), während man hemmende Elemente als exonische oder intronische Spleiß-Silencer (ESS: *exonic splice silencer*; ISS: *intrinsic splice silencer*) bezeichnet. Die intronischen Enhancer und Silencer können sowohl oberhalb als auch unterhalb des durch sie regulierten Exons liegen. Des Weiteren können sie sowohl in unmittelbarer Nähe zum betreffenden Exon liegen, aber auch über 1000 Basen entfernt davon (Ladd und Cooper, 2002). Obwohl die Bedeutung dieser Elemente heute allgemein akzeptiert ist, konnten bisher erst für wenige Gene solche Elemente eindeutig identifiziert werden. Der Mechanismus, mit dem sie das Spleißen regulieren, ist im Detail unklar. Bekannt ist, dass die Untereinheiten des Spleißosoms durch multiple RNA-RNA-, RNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen die Exon-Intron-Grenzen identifizieren und die beiden zum Entfernen eines Introns und Verbinden der Exons notwendigen Transesterifikationen katalysieren (Patel et al., 2003). Dazu ist es notwendig, dass die verschiedenen Untereinheiten des Spleißosoms die 5'- und 3'-Spleißstellen sowie die Verzweigungsstelle erkennen und daran binden.

3.4.2 Alternatives Spleißen

Unter alternativem Spleißen versteht man die Verwendung alternativer 3'- beziehungsweise 5'-Spleißstellen, wodurch aus einer ursprünglichen Prä-mRNA eine Vielzahl unterschiedlicher mRNAs und somit auch Proteine entstehen. Heute geht man davon aus, dass fast 60% der menschlichen Gene alternativ gespleißt werden (Modrek et al., 2002). Dabei können sonst eingespleißte Exons übersprungen, ein sonst nicht verwendetes Exon eingespleißt, Exons an ihrem 3'- oder 5'-Ende verlängert oder verkürzt, oder ganze Introns in der mRNA belassen werden (Cartegni et al., 2002; Black, 2003).

Welche Spleißstellen gewählt werden, hängt davon ab, wie stark die konkurrierenden Spleißstellen im jeweiligen zellulären Kontext von einem Enhancer oder Silencer beeinflusst werden (Smith und Valcarcel, 2000; Charlet et al., 2002). So können durch Einwirken von Wachstumsfaktoren, Hormonen oder elektrischen Impulsen, aber auch im Rahmen der Reaktion einer Zelle auf bestimmte Stressfaktoren, alternative Spleißmuster gewählt werden (Stamm, 2002; Faustino und Cooper, 2003).

3.4.3 Fehlspleißen und die Folgen

Man geht heute davon aus, dass 15% aller krankheitsassoziierten Punktmutationen in Spleißdefekten resultieren (Krawczak et al., 1992). Die Mehrzahl davon betrifft die klassischen 3'- oder 5'-Spleißstellen, sodass diese ihre Funktion verlieren und ein Exon übersprungen, ein Intron eingespleißt, oder eine nahe gelegene Spleißstelle genutzt wird. Seltener entsteht durch Mutation eine neue Spleißstelle, beziehungsweise es wird durch Zerstörung eines Silencers oder Formation eines Enhancers eine Pseudo-Spleißstelle genutzt (Cartegni et al., 2002; Faustino und Cooper, 2003). Oftmals werden die sehr variablen Enhancer und Silencer überhaupt erst dadurch identifiziert, dass eine Mutation in einem bestimmten Genbereich zu Spleißfehlern führt. Meist entsteht durch solche Spleißfehler ein vorzeitiges Stopkodon, welches bei der nachfolgenden Translation zum Abbruch der Aminosäurenkette und folglich zu einem funktionslosen Protein führt. Andererseits kann auch eine Schädigung der Spleißmaschinerie selbst zu veränderten mRNAs führen.

4 Fragestellung und Zielsetzung

Die DNA-Glykosylase MYH kann G:C→T:A-Transversionen verhindern, indem sie im Rahmen der *base-excision-repair* (BER) Adenin aus einer Fehlpaarung mit der oxidativ geschädigten Base 8-oxo-7,8-Dihydroguanin (8-oxoG) entfernt. Seit wenigen Jahren ist bekannt, dass die Inaktivierung beider Allele des *MYH*-Gens durch Keimbahnmutationen die Entstehung multipler kolorektaler Adenome und Karzinome verursachen kann.

Bisher liegen kaum Daten vor, wie häufig Träger pathogener mono- oder biallelischer *MYH*-Keimbahnvarianten in einem gemischten gastroenterologischen Patientenkollektiv sind und mit welchem Phänotyp sie sich präsentieren. Unklar ist auch die Pathogenität und klinische Bedeutung von in Introns lokalisierten genetischen Varianten. Die *MYH*-Prä-mRNA kann zudem alternativ gespleißt werden. Das Spektrum der Spleißvarianten ist bisher ebenfalls noch nicht ausreichend charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Häufigkeit der beiden *MYH*-Hotspotmutationen Y165C und G382D prospektiv in einem gemischten gastroenterologischen Patientenkollektiv nach Durchführung einer Koloskopie bestimmt und der koloskopische Befund mit dem *MYH*-Mutationsstatus abgeglichen werden.

Zur Klärung möglicher additiver genetischer Ursachen der MAP sollte das Spektrum der unterschiedlichen *MYH*-Prä-mRNA-Spleißvarianten näher charakterisiert werden. Des Weiteren sollte evaluiert werden, ob intronische *MYH*-Genvarianten das komplexe *MYH*-Prä-mRNA-Spleißen derart beeinflussen können, dass über einen Funktionsverlust der resultierenden *MYH*-Glykosylase möglicherweise eine MAP verursacht werden kann.

5 Material

5.1 Geräte

5.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Autoklav	HA-300M3CF	Wolf, Geislingen
Bakterienbrutschrank	WTB	Bindler, Tuttlingen
Bakterienschüttler	TR 225	Infors, Bottmingen
Feinwaage	A 30	Mettler, Gießen
Mikrowellenherd	SS 611	Bosch, München
PCR-Cycler	GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
	GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer, Weiterstadt
PH-Meter	Toledo MP 220	Mettler, Gießen
Pipetten	Pipetman 10µl, 20µl, 200µl, 1ml	Gilson, Villiers-le-Bel
Pipettierhilfe	Pipetus Akku	Hirschmann, Eberstadt
Sterilbank	Heraeus HS12	Kendro, Hanau
Tischzentrifugen	Micro Centrifuge SD 220 VAC	Roth, Karlsruhe
	Spectrafuge Mini C1301	Labnet, Woodbridge
Thermoblock	Thermomixer Compact 5350	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Reax Top	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	1092	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Rotanda 46R	Hettich, Tuttlingen
	5417C	Eppendorf, Hamburg
	5417R	Eppendorf, Hamburg
	5702	Eppendorf, Hamburg

5.1.2 Elektrophoresegeräte und Zubehör

Kämme und Formen	Horizon 11.4	Gibco, Eggenstein
Kammer	Horizon 11.4	Gibco, Eggenstein
Photoapparatur	MP4 Modell 44-16	Polaroid, Cambridge
Transformator	Power Supply E 835	Consort, Turnhout
Transilluminator	UV-T1	Biometra, Göttingen

5.1.3 Kühlgeräte

-80°C Schrank	Napcoil UF 600	Jouan, St. Herbluin
-20°C Raum	Kühlaggregat	Süd Electric, Horneburg
+4°C Raum	Kühlaggregat	Süd Electric, Horneburg
Eismaschine	UB 5035	Ziegra, Isernhagen

5.1.4 Analytische Geräte

Sequenzierautomat	Abi Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City
Hardware	Precision 340	Dell, Round Rock
Software	DNA Sequencing Analysis 3.7	Applied Biosystems, Foster City
Photometer	UV-DU 800	Beckmann-Coulter, Fullerton

5.2 Chemikalien

5.2.1 Allgemeine Chemikalien

Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat, Natriumsalz (SDS)	ICN Biomedicals, Eschwege
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LB-Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Luria Broth Base (LB)	Gibco BRL, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
M-MLV-RT 5X Reaction Buffer	Promega, Madison USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Dulbeccos PBS	Gibco BRL, Karlsruhe
Salzsäure	Riedel de Haen, Hannover
Tris-Base	US Biochemical, Cleveland
Trizol-Reagenz	Invitrogen, Groningen
X-Gal	Roth, Karlsruhe

5.2.2 Molekularbiologische Chemikalien

5.2.2.1 Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer

<i>Bgl</i> II	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Dpn</i> I	Stratagene, Heidelberg
<i>Mwo</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
NEB Puffer 3	New England Biolabs, Frankfurt

5.2.2.2 Primer zur MYH-Analyse

Alle verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Primer 3 Programms (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) ausgewählt und von der Firma Operon, Köln hergestellt.

5.2.2.2.1 Primer für die Mutagenese von Vektoren

Die die Mutation verursachende Base ist fett dargestellt.

Mutation	Sense 5'-3'	Antisense 5'-3'
Y165C	ggcctgggct g ctattctcgtgg	cggacccga c gataagagcacc
G382D	ctccctctcaga t ctgctggcag	ctgccagcagat t ctgagagggag

5.2.2.2.2 Primer zur *MYH*-Mutationsanalyse

Exon	Sense 5'-3'	Antisense 5'-3'
1	ctgCGGGagctgaaactg	taactcctgggCGTgcttta
2	cctTggaaggcctcaaaat	cctgaatctgcctttcatgg
7	cttccctggaggTgagagc	gagctgctgcagggtctct
13	ggaacagcctggggcccttg	caaataggcctgtggatatagcc
3-5	ccacaggctgctgtgtcc	gaggctctcatctggggctct
6-8	ctttggggTgggtgtagaga	ctacgttgccatccaccac
9-11	gtgccagcctccttct	agaactggaatggggcttct
12-14	tctaggTggccctaaagc	agcgattctccgtctcaaaa

5.2.2.2.3 Primer für die *MYH*-Spleißanalyse

Exons	Sense 5'-3'	Antisense 5'-3'
1-3 α	agctgaaactgCGccatc	acagaggcctgcaataccac
1-7 α	agctgaaactgCGccatc	gccggccacgagaatagtag
1-7 β	tccgtgttctgctgtcttca	acagaggcctgcaataccac
1-8 β	tccgtgttctgctgtcttca	cagggtctctgctgtacgtg

Sequenzierprimer M13R für Topo 2.1 Vektor (caggaacagctatgac)	Operon, Köln
Oligo (dT) ₁₅ -Primer	Promega, Madison

5.2.2.2.4 Primer für die Amplifikation von *MYH*-Intron 1

Zur Analyse der Basenabfolge des sehr großen Introns 1 musste dieses in sechs überlappende Fragmente zerlegt werden. Die Fragmente 1 und 6 mussten nochmals in jeweils zwei Fragmente unterteilt werden.

Fragment	Sense 5'-3'	Antisense 5'-3'
1A	agcaacagctcccagtaagc	gacgtctgaacggaagtctg
1B	cctccgtgttctgctgtctt	ctcccaaagtgctgggatta
2	gcagctaggcggTatagtcg	gtccaaagtCagtgccaggT
3	atcccccatcccattaattc	atgattgtgccactgcactc
4	ggcacatattagggggctct	cccataatctgttttgccaga
5	tgcacattgggagaaccata	tctcccaaagccaggataaa
6A	atggggTttcgccatgTt	atggcaaatCagtgggagaa
6B	tgTtgatggTcagccaccta	ttcctcatgatggcctgaa

5.2.2.2.5 Zusätzliche Sequenzierprimer für die *MYH*-Intron 1-Analyse

Zur Sequenzierung verschiedener Intron 1-Fragmente mussten zusätzliche Sequenzierprimer eingesetzt werden.

Fragment und Bezeichnung	5'-3'-Sequenz
Fragment 2 (intron 1-2sF)	ctgagcccatttcac
Fragment 2 (intron 1-2sR)	ggctagtcttgaactc
Fragment 3 (intron 1-3sF)	accttgaccacagtct
Fragment 4 (intron 1-4sF)	ggaggccgaggcgggt

5.2.2.3 Enzyme

Ampli Taq Gold-Polymerase
Proteinase K
M-MLV Reverse Transkriptase

Applied Biosystems, Foster City USA
Boehringer, Mannheim
Promega, Madison USA

5.2.2.4 DNA-Längenstandard und Nukleotide

DNA Molecular Weight Marker XIV
Fragmente einer Länge von 100 bis 2642 bp

Roche Applied Science, Penzberg

Lambda DNA/Eco 130I (STYI) Marker, 16
Fragmente einer Länge von 421 bis 19329 bp

Fermentas, Vilnius

Nukleotidmix #DNTP-100
Je 100mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Sigma, Deisenhofen

5.3 Verbrauchsmaterialien

Collection Tubes 2 ml
Eppendorfgefäße 1,5 ml
Desinfektionsmittel Freka Nol
Küvetten (10x10x45mm)
PCR-Reaktionsgefäße Multiply Pro
Petrischalen (150x20mm, 100x20mm)
Pipettenspitzen steril (10yl, 20yl, 200yl, 1ml)
Glaspipetten 5 ml/10 ml
Pipettenspitzen unsteril (0,2ml, 1ml)
Polypropylenröhrchen (15ml, 50ml)
Vacutainer-CPT- Röhrchen
Wasser steril
Zellulosemembran

Sigma, Deisenhofen
Sarstedt, Nümbrecht
Fresenius, Bad Homburg
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Starlab, Ahrensburg
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Becton Dickonson, Heidelberg
Braun, Melsungen
Whatman, Dassel

5.4 Kitsysteme

Big Dye Terminator 1.1. Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen

5.5 Vektoren und Bakterien zur Klonierung von DNA

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Klonierung von DNA der im *Topo TA Cloning Kit* enthaltene prokaryontische Klonierungsvektor pCR 2.1-Topo benutzt. Zur Transformation wurden jeweils kompetente *E.coli* Top 10 Bakterien der Firma Invitrogen mit folgendem Genotyp benutzt:

FmcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

5.6 Zugriffsnummern verwendeter Sequenzen

Homo sapiens <i>mutY</i> homolog, mRNA	NM_012222
Homo sapiens <i>mutY</i> homolog, <i>complete coding sequence</i>	AF527839
Homo sapiens <i>mutY</i> homolog, <i>protein</i>	CAI21720

5.7 Wichtige Datenbanken und Programme

Primersuche mit Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

Restriktionsenzymssuche mit NEB Cutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

Übersetzung der cDNA in die entsprechende Aminosäurenkette (www.expasy.org)

Mutationsdatenbank (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/search.php)

National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)

5.8 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel[®] und der SPSS[®]-Software. Um zu untersuchen, ob die Häufigkeiten verschiedener Merkmalsausprägungen in zwei statistisch unabhängigen Gruppen zufällig sind, wurden der Exakte Test nach Fisher und der Chi²-Test nach Pearson durchgeführt.

5.9 Patienten

5.9.1 Genehmigung der Studie

Die Durchführung dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Universität des Saarlandes genehmigt (Kennnummer des Ethikantrags 82/04).

5.9.2 Patientenauswahl

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben entstammen Patienten, die sich in der Zeit von Oktober 2004 bis April 2005 einer Koloskopie in der Abteilung für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes unterzogen haben. Allen in dieser Zeit untersuchten Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten, wurde unabhängig von der Indikation zur Koloskopie die Teilnahme an der Studie angeboten.

Die Einschlusskriterien waren:

1. Frauen und Männer im Alter von über 18 Jahren
2. Die Fähigkeit eine schriftliche Einverständniserklärung zu verstehen und zu unterschreiben
3. Patienten mit kolorektalen Adenomen, Patienten mit einer familiären Belastung für Polypen oder Karzinome des Kolorektums und Kontrollpersonen, bei denen aus medizinischer Indikation eine Koloskopie durchgeführt wurde
4. Die Möglichkeit zur Probenentnahme aus unauffälliger Kolonschleimhaut.

Ausschlusskriterien waren:

1. Eine fehlende Einwilligung
2. Die fehlende Möglichkeit zur Durchführung einer Koloskopie oder endoskopischen Probenentnahme

Die Patienten wurden über den wissenschaftlichen Hintergrund der Untersuchung, über das weitere Vorgehen bei Einwilligung, über möglicherweise entstehende Risiken durch die Probenentnahme und über Konsequenzen eines positiven genetischen Befundes informiert. Bei schriftlichem Einverständnis des Patienten wurde im Rahmen der Koloskopie eine zusätzliche Probe aus gesunder Kolonschleimhaut zur DNA-Extraktion entnommen. Neben den bei der aktuellen Koloskopie erhobenen Befunden wurden sämtliche Koloskopie-Vorbefunde sowie Informationen aus den Patientenakten bei der Klassifikation der Patienten in verschiedene Diagnosegruppen berücksichtigt.

Patienten, bei denen eine *MYH*-Mutation identifiziert wurde, wurden gebeten sich zur Befundbestätigung erneut in der Klinik vorzustellen. Mit aus einer frischen Blutprobe gewonnener DNA wurde die Untersuchung wiederholt. Bei der Wiedervorstellung wurde erneut eine ausführliche Anamnese erhoben und die Befunde besprochen.

5.9.3 Charakterisierung der untersuchten Patienten

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 352 Patienten auf Vorliegen einer Mutation im *MYH*-Gen untersucht. Davon waren 187 Männer und 165 Frauen. Das Durchschnittsalter betrug $54,5 \pm 17,6$ Jahre (Männer $54,9 \pm 17,4$ Jahre; Frauen $51,1 \pm 18,1$ Jahre). Der jüngste Patient war 18 Jahre alt, der älteste 89 Jahre alt.

Unter Berücksichtigung aller Befunde ließen sich die Patienten den unterschiedlichen Diagnosegruppen zuordnen (Tab. 2). Patienten mit ausschließlich hyperplastischen Polypen ohne adenomatöse Anteile wurden in die Gruppe der Patienten ohne relevante Darmerkrankung eingeschlossen. Vier Patienten mit APC-positiver FAP, zwei Patienten mit einem Lymphom, ein Patient mit Morbus Hirschsprung, ein Patient mit Turcot-Syndrom sowie fünf Patienten mit unspezifischer Darmentzündung wurden zu einer inhomogenen Gruppe (sonstige Diagnosen) zusammengefasst. Die Gruppe der Adenompatienten ließ sich noch weiter in Patienten mit oder ohne zusätzliches Karzinom unterteilen.

Tabelle 2: Studienpatienten und ihre Diagnosen

Diagnose:	Patientenzahl (M/F):	Alter (J):
Keine Darmkrankheit	116 (54/62)	54,7±16,2
Kolorektale Adenome	75 (49/26)	64,3±10,1
Kolorektale Adenome und mindestens 1 Karzinom	33 (23/10)	69,8±9,6
Kolorektales Karzinom ohne zusätzliche Adenome	23 (17/6)	63,7±13,7
Colitis ulcerosa	20 (11/9)	45,9±21,0
Morbus Crohn	72 (28/44)	37,9±12,7
Sonstige Diagnosen	13 (5/8)	46,6±21,3
Gesamt	352 (187/165)	54,5±17,6

M=Männer; F=Frauen; J=Jahre

6 Methoden

6.1 Allgemeine Methoden

6.1.1 Sterilisation von Lösungen und Gebrauchsmaterialien

Lösungen, Puffer und Nährmedien sowie unsterile Gebrauchsmaterialien wurden in feuchter Hitze bei 1-2 bar und 120°C für 20 Minuten autoklaviert. Thermolabile Lösungen wurden durch Sterilfiltration (0,45 µm Filter) entkeimt. Die Sterilisation von Glasgeräten erfolgte in trockener Hitze für mindestens 3 Stunden bei 180-200°C.

6.1.2 Extraktion von Nukleinsäuren

6.1.2.1 Extraktion von DNA aus Gewebeproben

Die Isolierung von DNA aus endoskopisch entnommenen und anschließend tiefgefrorenen Kolonschleimhaut-Biopsien erfolgte mit Hilfe des *Qiagen Tissue Kits*. Dabei handelt es sich um ein silikagelbasierendes Verfahren, das eine schnelle und zuverlässige Möglichkeit der Nukleinsäurepräparation darstellt. Zunächst wurden bis zu 25 mg Gewebe gemeinsam mit Proteinase K und einem Puffer zur Optimierung der Lysebedingungen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Nach ein bis zwei Stunden bei 55°C war das Gewebe vollständig gelöst. Nachfolgende Inkubation für 10 Minuten bei 70°C mit Zugabe von Puffer AL (Qiagen) zur Verbesserung der Bindungsbedingungen und anschließende Ethanolzugabe ermöglichte die Adsorption der DNA an die in ein Zentrifugenröhrchen eingesetzte Säule mit Silikagelmembran durch einen ersten Zentrifugationsschritt. Während DNA, aber auch RNA, dabei an der Membran haften bleibt, gelangen andere Zellbestandteile und Verunreinigungen durch die Membran hindurch. Verbliebene Verunreinigungen und Enzyminhibitoren wurden in zwei weiteren Zentrifugationsschritten entfernt. In einem letzten Schritt wurde die DNA wieder von der Membran gelöst und in einem Eppendorfgefäß, in welches die beladene Membran mit der Säule eingebracht wurde, während Zentrifugation bei 6000 g aufgefangen. Aufgrund der großen DNA-Menge in unseren Proben wurde dieser Elutionsschritt zweimal durchgeführt, um nahezu die gesamte DNA wieder von der Membran zu lösen. Die Lösung der DNA in Puffer AE (Qiagen) sorgt durch Optimierung des pH-Wertes für größtmögliche Stabilität der Nukleinsäure und ermöglicht deren Aufbewahrung bei -20°C.

6.1.2.2 Extraktion von DNA aus Vollblut

Bei der Verwendung von EDTA-Blut zur DNA-Extraktion mit Hilfe des *DNeasy Tissue Kit* wurden 200 µl Blut mit 200 µl Puffer AL (Qiagen) und 20 µl Proteinase K versetzt und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol (absolut) hinzugegeben und die Proben anschließend wie bei der Extraktion aus Gewebe (6.1.2.1) behandelt.

6.1.2.3 Extraktion von DNA aus Blutleukozyten

Die Blutentnahme erfolgte mit 10 ml *Vacutainer-CPT* Röhrchen. Anschließend wurden die Röhrchen mit dem Heparinblut 20 Minuten lang bei 20°C und 2730 rpm zentrifugiert. Der Überstand aus Leukozyten und Plasma wurde leicht geschüttelt und in 50 ml Röhrchen gegeben. Anschließend wurde dieser mit PBS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und mit 2000 rpm für weitere 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gefäß erneut mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach wiederholter Zentrifugation bei gleichen Einstellungen wurde der Überstand wiederum abgegossen und das entstandene Pellet mit am Gefäßrand zurücklaufendem Pufferrest (ca. 400 µl) resuspendiert. Je 200 µl der so entstandenen Suspension von gereinigten Leukozyten wurden mit 200 µl Puffer AL und 25 µl Proteinase K gemischt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Hinzufügen von 210 µl Ethanol und Aufbringen des Ansatzes auf eine Silikagelmembran erfolgten die weiteren Schritte analog zur Extraktion von DNA aus Gewebeproben (6.1.2.1) Die DNA-Menge aus 10^7 Leukozyten lag bei 1-3 µg/µl.

6.1.2.4 Extraktion von RNA aus Vollblut

Die Isolation von RNA erfolgte mit Hilfe von *Trizol*, einer Lösung aus Phenol und Guanidinisothiozyanat. Das in *Vacutainern* entnommene Blut wurde zunächst behandelt wie in Abschnitt 6.1.2.3 beschrieben. Das durch die Zentrifugationsschritte entstandene Leukozytenpellet aus 10 ml Blut, das ungefähr 10^7 Zellen entspricht, wurde nun mit 1 ml *Trizol* versetzt. Durch repetitives Pipettieren und anschließendes fünfminütiges Inkubieren bei 15-30°C wurden die Zellen aufgelöst und die einzelnen Zellbestandteile voneinander getrennt. Nachfolgend wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und für 15 Minuten bei höchstens 12000 g und 2-8°C zentrifugiert, sodass eine Trennung in verschiedene Phasen erfolgte. Dabei befinden sich die Proteine immer in der unteren Phenol-Chloroform-Phase, die DNA ist in der Interphase und die RNA in der wässrigen Oberphase. Zur RNA-Isolation wurde daher die Oberphase mit 0,5 ml Isopropanol versetzt, für 10 Minuten bei 15-30°C inkubiert und schließlich bei 12000 g 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene gelartige RNA-Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes gewaschen, indem es mit 1 ml Ethanol (75%)

vermischt und dann bei 7500 g zentrifugiert wurde. Die gewaschene RNA konnte nun in 20 µl RNase-freiem Formamid bei -80°C aufbewahrt werden.

6.1.3 Analyse der Ausbeute und Reinheit der Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden Absorptionsmessungen bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten durchgeführt. Für die Konzentrationsmessung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und die Konzentration anhand folgender Richtwerte ermittelt:

dsDNA:	1 A ₂₆₀	≈	50 µg/ml
RNA:	1 A ₂₆₀	≈	40 µg/ml

Als Reinheitskriterium diente der Quotient ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$), der bei reiner DNA zwischen 1,7 und 1,9 liegt.

6.1.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Der elektrophoretische Nachweis von DNA sowie deren Längenbestimmung erfolgt in Agarosegelen. Unter Elektrophoresebedingungen liegen Nukleinsäuren als Polyanionen vor und wandern, wie auch andere geladene Biomoleküle, im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Beweglichkeit im Gel ist dabei abhängig von der Länge des DNA-Moleküls, den Eigenschaften des Laufpuffers und der Porengröße des Trägers.

6.1.4.1 Auswahl und Herstellung der Gele

Aufgrund der Größe der erzeugten PCR-Produkte wurden für deren Auftrennung ausschließlich zweiprozentige Gele verwendet, da diese sich für Kettenlängen zwischen 0,1 und 2 kb eignen. Zur Auftrennung von Plasmiden wurden einprozentige Gele benutzt, die sich für Kettenlängen bis zu 6 kb eignen. Zur Herstellung der Gele wurden bei 2%igen Gelen 2 g Agarose, beziehungsweise 1 g Agarose bei einprozentigen Gelen, durch Aufkochen in 100 ml einfach konzentriertem TAE-Puffer gelöst, anschließend 1,5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und nach Abkühlen auf 60°C in eine Gießkammer eingefüllt. Anschließend wurden zwei Probenkämme mit je 20 Zähnen eingesetzt, die nach ihrer Entfernung aus dem erkalteten Gel die Taschen für den Probenauftrag hinterlassen.

Der für die Gelherstellung benötigte TAE-Puffer wurde zunächst in 40-facher Konzentration zubereitet. Hierzu wurden 193,82 g Tris-Base mit 65,62 g Natriumacetat (Trihydrat) und 29,78 g EDTA gemischt und mit destilliertem Wasser auf 800 ml gelöst. Diese Lösung wurde dann noch mit 50 ml Essigsäure versetzt und anschließend auf einen pH von 8,3 eingestellt.

Durch Auffüllen mit Wasser auf ein Volumen von 1 l entstand 40-fach konzentrierter TAE-Puffer. Wurden hiervon 25 ml zu 1 l destilliertem Wasser gegeben, so erhielt man die gewünschte einfache Konzentration.

6.1.4.2 Vorbereitung der Proben

In der Regel wurden 10 µl der zu analysierenden DNA mit 4 µl Probenauftragungspuffer vermischt. Dieser sorgt dafür, dass die Oberflächenspannung herabgesetzt wird und die Probe aufgrund der größeren Dichte des Puffers statt wegzuschwimmen in die Taschen des Gels absinkt. Zusätzlich wird die Probe durch den blauen Farbstoff des Puffers besser sichtbar. Entsprechend wurden auch 4 µl DNA-Größenstandard mit 4 µl Probenauftragungspuffer gemischt. Bei der Herstellung dieses Puffers wurden 250 µl TAE-Puffer (40x) zu 3,75 ml Wasser gegeben. In der Folge wurden noch 5 ml Glycerin und 1 ml SDS (0,5%) hinzugefügt. Die vorsichtige Zugabe von Bromphenolblau sorgte für die gewünschte Färbung.

6.1.4.3 Durchführung der Elektrophorese

Das erstarrte Gel wurde nach Entfernen der Kämmen in eine mit einprozentigem TAE-Puffer gefüllte Horizontal-Gelapparatur gelegt und die Proben vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung und zur Zuordnung von Nukleinsäurefragmenten wurde stets eine Tasche mit DNA-Längenstandard befüllt.

Anschließend wurde je nach Aufgabenstellung für 20-40 Minuten eine Spannung von 110 V bei 400 W angelegt. Durch Interkalieren des Ethidiumbromids zwischen die Basen der DNA konnten diese nach Anregung mit UV-Licht (305 nm) auf einem Transilluminator als rot-orange leuchtende Banden sichtbar gemacht werden und mit einer Polaroidkamera fotografiert werden. Die Fragmentgrößen wurden durch Vergleich der Wanderungsstrecke der Proben mit denjenigen der Fragmente definierter Länge des Größenstandards bestimmt.

6.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1986 von Mullis (Mullis et al., 1986) entwickelte PCR ermöglicht es, *in vitro* durch enzymatische Reaktion millionenfach Kopien von einer beliebigen Nukleotidsequenz herzustellen. Dieser als Amplifikation bezeichnete Vorgang macht auch sehr geringe DNA-Mengen schnell einer Analyse zugänglich. Die Vorgänge bei der Vervielfältigung ähneln dabei denjenigen der natürlichen Replikation.

Nach der Hitzedenaturierung doppelsträngiger DNA hybridisieren synthetische DNA-Oligonukleotide, sogenannte Primer, an die nun einzelsträngig vorliegende Template-DNA. Vom 3'-Ende des damit entstandenen doppelsträngigen Bereiches aus synthetisiert eine

hitze stabile Polymerase den neuen Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares, das den gewünschten Abschnitt flankiert, kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Ein einzelner Zyklus besteht somit aus Denaturierung gefolgt von der Primeranlagerung (*annealing*) und der Polymeraseaktivität (*extension*). Entscheidendes Prinzip der PCR ist jedoch die zyklische Wiederholung dieser Abfolge. Dabei sorgt die Hitze Stabilität der verwendeten Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* beziehungsweise der von dieser abgeleiteten kommerziell erhältlichen Polymerasen dafür, dass nach jeder Denaturierung eine kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne erneute Enzymzugabe möglich ist.

6.1.5.1 Wesentliche Komponenten und allgemeines Pipettierschema

Essentielle Bestandteile einer PCR sind Primer, Nukleotide, Polymerase und insbesondere die Template-DNA. Dabei hat vor allem das Design der Primer entscheidenden Einfluss auf Menge und Qualität des gewünschten Produktes. So sollen die Primer unter anderem zwischen 18 und 30 Nukleotide lang sein, der GC-Gehalt soll 40-60% betragen und die Sequenz am 3'-Ende muss so gestaltet sein, dass Primer-Dimerisierungen verhindert werden. Die am häufigsten in der PCR eingesetzte Polymerase ist die *Taq*-Polymerase mit einem Aktivitätsoptimum von 75°C. Zusätzlich zu diesen essentiellen Bestandteilen sorgt ein spezieller Puffer durch Optimieren der Reaktionsbedingungen für ein besseres Funktionieren der PCR und somit auch zu einem Anstieg der Produktmenge.

Beim Ansetzen des Reaktionsgemischs einer Standard-PCR wurden pro Probe je 5 µl der Primer (10 µM) in Sense- und Antisense-Richtung sowie 5 µl eines Nukleotidgemisches und 0,5 µl *Ampli-Taq-Gold* zu 15 µl sterilem Wasser gegeben. Zur Optimierung der PCR-Bedingungen hinsichtlich pH-Wert und MgCl₂-Konzentration wurde diesem Ansatz dann noch 10 µl eines PCR-Reaktionspuffers hinzugefügt. Dazu standen vier verschiedene Puffer (A, B, C, D) mit unterschiedlicher MgCl₂-Konzentration zur Verfügung. Es wurde jeweils derjenige Puffer gewählt, der bei der Amplifikation des gewünschten Genabschnitts im Vergleich zu den anderen die größte spezifische Produktausbeute ermöglichte. Zu diesem PCR-Mix wurde anschließend noch eine variable Menge, in der Regel 10 µl, der zu vermehrenden Proben-DNA pipettiert. Wurde ein größeres Volumen eingesetzt, so wurde das Gesamtvolumen von 50 µl durch entsprechendes Senken der Wassermenge konstant gehalten. Sollte von mehreren Proben der gleiche DNA-Abschnitt amplifiziert werden, wurde generell ein gemeinsamer PCR-Ansatz zusammengemischt, der die einzelnen Komponenten in vielfacher Menge, jedoch keine DNA, enthält. Dieser sogenannte Master-Mix wurde dann zu

gleichen Teilen auf die benötigten Reaktionsgefäße aufgeteilt und jeweils eine andere Proben-DNA hinzugefügt.

Um Verfälschungen der Ergebnisse zu verhindern, ist beim Ansetzen der PCR strengstens darauf zu achten, dass außer der Probe keine andere DNA in den Ansatz gelangt, die dann vermehrt werden könnte. Deshalb wurden zur PCR ausschließlich sterile Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße sowie steriles Wasser verwendet. Um Kontaminationen, die trotz dieser Maßnahmen entstanden, erkennen zu können, wurde bei jedem PCR-Experiment zusätzlich eine Negativkontrolle angefertigt. Diese wurde mit den Ansätzen für die Proben in einem gemeinsamen Mastermix angesetzt und anschließend, bis auf die Zugabe von sterilem Wasser statt der Proben-DNA, identisch mit den Patientenansätzen behandelt. Fand in der Negativkontrolle eine Amplifikation statt, so konnte von einer Verunreinigung einer oder mehrerer Komponenten ausgegangen werden und die Produkte dieses PCR-Experiments mussten verworfen werden.

6.1.5.2 Herstellung des Nukleotidmixes und der PCR-Puffer

Zur Herstellung der Mischung der verschiedenen Desoxynukleosidtriphosphate wurden die Sigma#DNTP-100 Nukleotide zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden jeweils 25 µl (100mM) dATP, dCTP, dGTP, dTTP zu 900 µl sterilem Wasser gegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 1 ml erreicht wurde.

Bei der Herstellung der verschiedenen PCR-Puffer wurden 3,63 g Tris Base (300 mM) mit 0,99 g Ammoniumsulfat (75 mM) gemischt und mit sterilem Wasser auf 70 ml aufgefüllt. Mit Hilfe von HCl oder NaOH wurde der pH-Wert der Lösung auf 8,5 eingestellt. Nachfolgend wurde mit Wasser auf ein Volumen von 90 ml aufgefüllt und jeweils 22,5 ml auf vier Röhren (A-D) verteilt. Anschließend wurde durch Lösen von 1,02 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat in 10 ml PCR-Wasser eine 500 mM MgCl₂-Lösung erzeugt. Den Puffern A, B, C, D wurden dann unterschiedliche Mengen Wasser und MgCl₂-Lösung hinzugefügt (Tab. 3). Von jedem Puffer wurden mehrere 1 ml-Aliquots sterilfiltriert und in 1,5 ml Cups bei -20°C tiefgefroren.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen Puffer zur PCR-Optimierung

Puffer	MgCl₂Konzentraion	MgCl₂ 500mM	PCR-Wasser
A	7,5 mM	375 µl	2130 µl
B	10 mM	500 µl	2000 µl
C	12,5 mM	625 µl	1880 µl
D	17,5 mM	875 µl	1630 µl

6.1.5.3 Durchführung der PCR in einem Thermo-Cycler

Die PCR-Reaktionen wurden in *Applied Biosystems 9600* und *9700* Thermocyclern durchgeführt. Diese sind durch einen temperierbaren Reaktionsraum gekennzeichnet, in den die Probengefäße gestellt werden. Eine automatische Steuerung regelt das zyklische Temperaturprogramm, wobei die jeweilige Temperatur und Zeit pro Reaktionsschritt sowie die Zyklenzahl individuell programmierbar sind. Bei einer Standard-PCR zur Vermehrung bestimmter Genabschnitte wurden die Proben in der Regel für 30 Sekunden auf 95°C erhitzt um die Doppelstränge zu denaturieren. In einem nächsten Schritt wurde für weitere 30 Sekunden eine Temperatur von 55°C eingestellt um optimale Bedingungen für die Primeranlagerung zu schaffen. Zuletzt wurde dann die Temperatur für 1 Minute auf 72°C erhöht, um der *Taq*-Polymerase die Synthese der neuen Doppelstränge zu ermöglichen. Diese drei Temperaturschritte wurden standardmäßig 35mal zyklisch durchlaufen. Vor Beginn der zyklischen Abläufe wurde für zehn Minuten eine Temperatur von 95°C gehalten um möglichst alle Doppelstränge vollständig zu denaturieren. Nach Ende des letzten Zyklus sollte der Polymerase durch konstante 72°C ermöglicht werden, innerhalb von zehn Minuten alle eventuell unvollständigen Stränge zu kompletieren.

6.1.6 Reverse-Transkriptase-PCR

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR lassen sich spezifische RNA-Sequenzen amplifizieren. Zunächst erfolgt eine cDNA Erststrangsynthese durch Umschreiben der RNA-Matrize mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die als Reverse Transkriptase bezeichnet wird. Nachfolgend wird die nun entstandene cDNA in einer leicht modifizierten PCR vervielfältigt.

6.1.6.1 Herstellung des cDNA-Erststranges

Das Umschreiben der RNA in cDNA setzt voraus, dass ein Primer mit der RNA hybridisiert und so als Startpunkt für die Polymerasereaktion dient. Hierzu wurden entweder Oligo-dT-Primer oder aber genspezifische Primer (gSP) verwendet. Die Oligo-dT-Primer binden am mRNA-typischen 3'-poly-A-Schwanz und sorgen somit für eine selektive Übersetzung der kompletten mRNA aus der Gesamt-RNA. Dagegen wird bei Einsatz eines genspezifischen Primers in Antisense Richtung nur das gewünschte Transkript in cDNA umgeschrieben, was bei seltenen Transkripten die Menge an Nebenprodukten verringern kann.

Zunächst wurden steriles Wasser, der gewünschte Primer und die umzuschreibende RNA auf Eis gemischt (Tab. 4).

Tabelle 4: Pipettierschema für die Herstellung einer cDNA aus RNA

Bei Verwendung genspezifischer Primer (gSP) werden nur die RNAs, die die genspezifische Sequenz enthalten in cDNA umgeschrieben. Bei Einsatz der oligo-dT-Primer, die am mRNA-typischen poly-A-Schwanz binden, wird die Gesamtheit der mRNAs übersetzt.

Zusammensetzung	gSP-Ansatz	Oligo-(dT)-Ansatz
Wasser steril	12 µl	11 µl
Oligo (dT) ₁₅ -Primer	-	2 µl
Genspezifischer Primer (gSP) 100 µM	1 µl	-
RNA	1 µl	1 µl
Gesamtvolumen	14 µl	14 µl

Durch sofortiges Erhitzen (70°C) dieser Ansätze über 5 Minuten und anschließendes einminütiges Schockkühlen auf Eis wurde die teilweise in Sekundärstrukturen unzugänglich vorliegende RNA denaturiert und somit für die reverse Transkription vorbereitet. Anschließend wurden jeweils 5 µl eines Desoxynukleotidmixes und eines speziellen Reaktionspuffers (*M-MLV 5X Reaction Buffer*) sowie 1 µl der Reversen Transkriptase (*M-MLV-RT*) hinzugefügt. Die Synthese des cDNA-Erststranges erfolgte dann bei 42°C für die Dauer einer Stunde. Das so entstandene DNA-Produkt kann bei -20°C aufbewahrt werden.

6.1.6.2 Vermehrung der cDNA

Die Vorgänge bei der Vermehrung von cDNA entsprechen grundsätzlich denjenigen bei der Vermehrung genomischer DNA. Da jedoch lediglich 0,5 µl des unverdünnten cDNA Erststranges eingesetzt werden müssen, wird ein konstantes PCR-Gesamtvolumen durch Zugabe von 24 µl sterilem Wasser gewährleistet. Die Cyclereinstellungen wurden ebenfalls den Anforderungen entsprechend optimiert (Tab. 5).

Tabelle 5: Thermocycler-Temperaturschema für die Amplifikation von cDNA

	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95°C	5 Minuten
40 Zyklen		
Denaturierung	95°C	30 Sekunden
Primeranlagerung	55°C	30 Sekunden
Elongation	72°C	90 Sekunden
Vervollständigung der Elongation	72°C	10 Minuten

6.1.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung von bis zu 10 µg PCR-Produkt mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* wurde dieses mit dem fünffachen Volumen von Puffer PB (Qiagen) versetzt. Dieser schafft optimale Salzkonzentrationen und pH-Werte für die Bindung über 100 bp großer Produkte an eine Silikagelmembran im nachfolgenden Zentrifugationsschritt. Dagegen gelangen kürzere Produkte, überschüssige Primer, Nukleotide und Enzyme durch die Membran hindurch und konnten verworfen werden. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die gereinigten PCR-Produkte in 50 µl Puffer EB (Qiagen) eluiert und konnten bei 4°C aufbewahrt werden.

Sollten neben Enzymen und überschüssigen PCR-Komponenten auch Nebenprodukte, die länger als 40 bp sind, aus dem PCR-Produkt entfernt werden, oder nur ein Fragment des Produktes nach dem Restriktionsverdau weiterverarbeitet werden, so wurde der *QIAquick Gel Extraction Kit* benutzt. Hierbei wurde die DNA zunächst in einem Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde durch Größenvergleich mit dem Längenstandard identifiziert und anschließend mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Dagegen verblieben kürzere und längere Fragmente sowie Verunreinigungen im Gel. Das ausgeschnittene Gelstück wurde dann mit einem dreifachen Volumen an Puffer QG (Qiagen) versetzt und für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Dieser Schritt dient dem Lösen des Gels und verbessert die Bedingungen für die DNA-Adsorption an die Silikagelmembran. Nach Übertragen der Lösung auf die Membran erfolgten die Wasch- und Elutionsschritte wie bei Verwendung des *PCR Purification Kit*.

6.1.8 Sequenzierung von DNA

Die Bestimmung der Basensequenz eines PCR-Produkts geschieht heute zumeist durch das Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977). Dabei handelt es sich um eine enzymatische Methode, bei der die zu analysierende DNA als Matrize für die Synthese neuer DNA-Fragmente mit Hilfe einer DNA-Polymerase dient. Analog zu den Vorgängen bei einer normalen PCR wird bei dieser Sequenzierungs-PCR ein Primer an die denaturierte DNA gebunden. Ausgehend von diesem erfolgt dann die Synthese des komplementären Stranges. Dabei ist es außerordentlich wichtig, dass entweder der Primer in Sense- oder derjenige in Antisense-Richtung eingesetzt wird, jedoch nie beide gleichzeitig. Es kann also immer nur einer der beiden nach Denaturierung entstandenen Einzelstränge und niemals auch der dazu komplementäre Strang oder ein neu synthetisierter Strang als Matrize dienen, da hierzu der gegenläufige Primer nötig wäre. Die Produkte sind also alle entweder in Sense- oder Antisense-Richtung ausgerichtet. Neben allen vier 2'-Desoxynukleotidtriphosphaten befinden sich zusätzlich die entsprechenden 2',3'-Didesoxynukleotid-

triphosphate (ddNTPs) im Reaktionsansatz. Bei Verwendung einer Polymerase, welche beide akzeptiert, kommt es nach Einbau der Didesoxyform zum Kettenabbruch. Da der Zeitpunkt, wann ein Didesoxynukleotid eingebaut wird, zufällig ist, entstehen Produkte in allen Längenabstufungen von der Länge des eingesetzten Primers bis hin zur vollständigen Länge des ursprünglich eingesetzten Fragments. Dabei ist allen gemeinsam, dass sich am 3'-Ende ein Didesoxynukleotid befindet. Wird jedes dieser 4 ddNTPs mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert, so kann durch Detektion des Farbstoffs am Ende der unterschiedlich langen Produkte die jeweils letzte Base nach Größenauftrennung der Fragmente visualisiert werden.

6.1.8.1 Durchführung einer Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem *Big Dye Terminator 1.1. Cycle Sequencing Kit* in einem *Applied Biosystems 9600* oder *9700* Thermocycler durchgeführt. Hierbei wurden pro 2,5 µl zu analysierender DNA 1 µl Primer (10 µM) und 2 µl des BigDye Reaktionsgemischs, welches eine Polymerase und Nukleotide sowie einen Reaktionspuffer in aufeinander abgestimmter Konzentration enthält, eingesetzt. Durch Zugabe von 4,5 µl sterilen Wassers wurde ein Gesamtvolumen von 10 µl eingestellt. Die Sequenzierungs-PCR wurde nach einem den Anforderungen angepassten Temperaturschema (Tab. 6) durchgeführt.

Tabelle 6: Thermocycler-Temperaturschema einer Sequenzierungs-PCR

	Temperatur	Zeit
Aktivierung	96°C	1 Minute
35 Zyklen		
Denaturierung	96°C	10 Sekunden
Primeranlagerung	50°C	5 Sekunden
Elongation	60°C	4 Minuten

6.1.8.2 Aufreinigung der Produkte

Mit dem *DyeEx 2.0 Spin Kit* wurden die Produkte der Sequenzierungsreaktion durch eine Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Dazu wurde der Sequenzierungs-PCR-Ansatz zunächst auf eine spezielle Gelsäule gegeben, die Poren einheitlicher Größe aufweist, und anschließend zentrifugiert. Während überschüssige Komponenten des Reaktionsansatzes, welche die anschließende Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe stören könnten, in diese Poren diffundieren und dort gebunden werden, gelangen die zu analysierenden DNA-Fragmente aufgrund des höheren Molekulargewichts hindurch. Diese konnten dann in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen werden und anschließend ausgewertet werden.

6.1.8.3 Sequenzanalyse durch Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen

Die Sequenzanalyse erfolgte automatisch in einem *Abi Prism 3100 Genetic Analyzer*. Dazu wurden die aufgereinigten Proben luftblasenfrei auf eine spezielle, 96 Vertiefungen zur Aufnahme von Proben aufweisende, Sequenzierplatte aufgetragen. Diese wurde dann im Sequenzierautomaten befestigt und die automatische Analyse gestartet. Hierbei taucht zunächst eine Kapillare in die zu analysierende Probe ein. Innerhalb der Kapillare werden die Produkte der Sequenzierungs-PCR elektrophoretisch entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Ein Argonlaser sorgt dann mit Wellenlängen von 488 und 514 nm für eine Anregung der Farbstoffe am Ende jedes Fragmentes. Durch einen Fluoreszenzdetektor können nun die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale in der Reihenfolge der Produktlängen erfasst werden und durch spezielle Computerprogramme direkt in die DNA-Sequenz übersetzt werden.

6.1.8.4 Direktsequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Direktsequenzierung von Plasmiden ohne zwischengeschaltete PCR wurden 0,5 µl Plasmid-DNA aus einer vorausgegangen Plasmid-Minipräparation unverdünnt eingesetzt. Hierbei wurde die DNA in einen Ansatz aus 7 µl sterilem Wasser, 2 µl Big Dye und 0,5 µl einer 10 µM Lösung eines plasmidspezifischen Sequenzierprimers gegeben. In unseren Versuchen wurden ausschließlich Topo 2.1 Vektoren und der dazugehörige M13R-Primer (5.2.2.2.3) verwendet. Die Sequenzierungs-PCR wurde wie in Abschnitt 6.1.8.1 beschrieben durchgeführt.

6.1.9 Klonierung von PCR-Produkten

Als Klonierung bezeichnet man das Einschleusen beliebiger DNA-Sequenzen in einen Klonierungsvektor. Diese DNA-Abschnitte können anschließend vermehrt, analysiert oder genetisch manipuliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der RT-PCR (6.1.6) erzeugte DNA-Sequenzen zur MYH-Transkriptanalyse (6.2.3.) in den im *Topo TA Cloning Kit* enthaltenen prokaryotischen Klonierungsvektor pCR 2.1-Topo eingeschleust.

Hierzu wurden 4 µl des aufgereinigten PCR-Produktes zu 1 µl des im Kit enthaltenen *pCR 2.1-Topo*-Vektors gegeben und das Volumen mit sterilem Wasser auf 5 µl eingestellt. Die Zugabe von 1 µl einer bereitgestellten Salzlösung sorgte für optimale Reaktionsbedingungen. Nach sorgfältiger Durchmischung der Mixtur wurde diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für die folgende Transformation auf Eis aufbewahrt.

Der *pCR 2.1-Topo*-Vektor liegt linearisiert vor und besitzt an den freien 3'-Enden ein überhängendes Thymidin. Bei Vervielfältigung von DNA mit der *Taq*-Polymerase wird

unabhängig von der Matrize immer ein Adenosin am 3'-Ende des neu gebildeten Stranges angehängt. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Thymin des Vektors und dem Adenin eines beliebigen PCR-Amplifikats kann dieses in den Vektor eingebaut werden. Durch eine Topoisomerase, welche durch eine energiereiche Phosphodiesterbindung mit dem 3'-Ende des Vektors verbunden ist, wird der Einbau enzymatisch katalysiert, sodass dem Reaktionsansatz keine Ligase zugesetzt werden muss.

6.1.9.1 Herstellen von Medien für die Bakterienkultur

Standardmedium für die Kultivierung von *E.coli* ist LB (*Luria broth*). Die aufgeführten Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. In sterilem Zustand benötigte Lösungen wurden für 20 Minuten bei 1,3 bar autoklaviert. Für das Gießen von Agarplatten wurden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren noch 12 g Agar pro Liter hinzugefügt.

LB-Medium: Fertigpulver der Firma Gibco BRL, Karlsruhe 25 g zu 1 l

Zusammensetzung: 10 g Pepton aus Fleisch, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pro l

LB-Agar: Fertigpulver der Firma Gibco BRL, Karlsruhe 37 g zu 1 l

Zusammensetzung: 10 g Pepton aus Fleisch, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 12 g Agar pro l

SOC-Medium: Fertigmedium der Firma Invitrogen, Groningen

Zusammensetzung: 20 g Pepton aus Fleisch, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl, 2,4g MgSO₄ Heptahydrat, 20 mM Glucose pro l

Nach Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C wurde dem entsprechenden LB-Medium zur Herstellung eines Selektionsmediums Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Ampicillin wurde als Stammlösung in tausendfacher Konzentration mit Wasser angesetzt, steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt.

Um die Unterbrechung der *lacZ*-Produktion durch Inserts in Plasmiden zu detektieren, wurden die Agarplatten zusätzlich mit 40 µl einer 2%igen Stammlösung von X-Gal behandelt.

6.1.9.2 Transformation von Bakterien

Zunächst wurde eine geeignete Menge mit Ampicillin und X-Gal versetzter Agarplatten unter dem Abzug getrocknet. 50 µl Suspension kompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und die Bakterien danach bis zum Abschluss der Transformation eisgekühlt. Von dem Plasmidansatz der *TOPO TA Cloning*-Reaktion oder einem beliebigen durch Maxi- oder

Minipräparation isolierten Plasmid wurden 2 µl zu den Bakterien gegeben, der Ansatz durch Umrühren gemischt und 10-30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach erfolgte eine genau 30 Sekunden dauernde Erhitzung in einem 42°C warmen Wasserbad, wobei die Bakterien danach sofort wieder auf Eis gestellt wurden. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Je Agarplatte wurden dann 20 µl der Lösung mit einem sterilen Glasspatel ausgestrichen und die Platten im Brutschrank kopfüber bei 37°C über mindestens 16 Stunden inkubiert.

6.1.9.3 Selektion und Vermehrung rekombinanter Klone

Nicht transformierte *Top 10* Bakterien sind ampicillinempfindlich und wachsen nicht auf ampicillinhaltigem Agar. Dagegen bilden Bakterien, die den Vektor (*pCR 2.1-Topo*) mit seinem Ampicillinresistenzgen aufgenommen haben auf Selektivagar Kolonien. Der Einbau der PCR-Produkte in den Vektor erfolgt im Bereich des *LacZ*-Gens, welches für die β-Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym erlaubt es Bakterien in die Agarplatte eingebrachtes X-Gal zu verstoffwechseln, wodurch sich die betreffenden Kolonien blau färben. Durch Insertion eines PCR-Produkts in den Vektor wird das *lacZ*-Gen zerstört, sodass X-Gal nicht mehr verstoffwechselt werden kann. Deshalb konnten inserttragende Klone durch ihre fehlende Blaufärbung von Bakterienkolonien unterschieden werden, die mit einem leeren Vektor transformiert wurden (Blau-Weiß-Screening). Zur weiteren Vervielfältigung der Bakterien und damit auch des inserttragenden Plasmids wurde je eine weiße Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte entnommen, in 5 ml LB-Selektivmedium transferiert und über Nacht bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Aus diesen Kulturen konnten dann die Plasmide mittels Minipräparation isoliert und durch direkte Sequenzierung analysiert werden.

6.1.10 Einführen einer Mutation in ein Gen

Zur Einführung von Mutationen in ein bestimmtes Gen wurde der *Quik Change Site Directed Mutagenesis Kit* benutzt. Bei der *site-directed-mutagenesis* werden die als Vektor eingesetzten doppelsträngigen Plasmide nach Insertion des zu modifizierenden DNA-Produkts denaturiert. Primer in Sense- und Antisense-Richtung, die jedoch den gewünschten Basenaustausch aufweisen (5.2.2.2.1), hybridisieren anschließend mit dem in das Plasmid eingebauten unmutierten Genabschnitt. Die *Pfu-Turbo DNA Polymerase* vervollständigt den Plasmideinzelstrang vom Primer ausgehend schließlich wieder zu einem nun linearisierten vorliegenden Doppelstrang. Durch zyklische Wiederholung dieser Schritte entstehen immer mehr Produkte, die aufgrund der eingebauten Primer die gewünschte Mutation tragen. Die zu Beginn der Reaktionen eingesetzte unmutierte Plasmid-DNA unterscheidet sich von den in

den zyklischen Abläufen entstandenen Kopien dadurch, dass sie durch ihre Herkunft aus Bakterien, die das Enzym dam-Methylase exprimieren, an GATC-Sequenzen methyliert ist. Durch Zugabe des Restriktionsenzym *Dpn I*, welches ausschließlich methylierte DNA dieser Sequenz schneidet, können die unmutierten Mutter-Stränge selektiv zerstört werden. Nach Transformation von Bakterien wird die entstandene linearisierte Kopie des Plasmids mit seinem mutierten Insert wieder in die typische Ringform überführt und vermehrt.

Zu 5 µl eines im Kit enthaltenen Reaktionspuffers wurden 5-50 ng Plasmid-DNA, jeweils 1 µl des Nukleotidmixes und der *Pfu Turbo* Polymerase sowie jeweils 125 ng der beiden Primer gegeben und das Volumen mit sterilem Wasser auf 50 µl erhöht. Die Produktbildung erfolgte in einem Thermocycler nach einem festgelegten Temperaturschema (Tab. 7).

Tabelle 7: Thermocycler-Temperaturschema zur Durchführung der *site-directed-mutagenesis*

	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95°C	30 Sekunden
12 Zyklen		
Denaturierung	95°C	30 Sekunden
Primeranlagerung	55°C	1 Minute
Elongation	68°C	1 Minute/kb Plasmidlänge

Zum Verdau der parentalen DNA wurde 1 µl *Dpn I* zu jedem Ansatz gegeben und dieser dann für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 50 µl *Top 10*-Bakterien mit 1 µl der erhaltenen DNA transformiert (6.1.9.2) und auf Selektivagar ausgebreitet. Inserttragende, weiße Kolonien wurden entnommen, vermehrt und in einer Minipräparation die mutierten Plasmide gewonnen. Durch Direktsequenzierung konnten die eingeführten Mutationen nachgewiesen werden.

6.1.11 Restriktionsschnitt von DNA

Bakterien schützen sich durch spezielle Restriktionsendonukleasen vor dem Eindringen fremder DNA. Bisher konnten nahezu 1000 verschiedene dieser Restriktionsenzyme identifiziert werden, wobei der Name sich immer von dem bakteriellen Stamm ableitet, aus dem es isoliert wurde. Da diese Enzyme doppelsträngige DNA mit sehr hoher Spezifität schneiden, werden sie besonders oft in der Gentechnik eingesetzt. In unseren Versuchen wurden ausschließlich Typ-2-Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die nur Magnesium als Kofaktor benötigen und sich dadurch auszeichnen, dass sie die DNA innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz schneiden. Spalten die Enzyme die Erkennungssequenz symmetrisch, so entstehen glatte Enden. Erfolgt der Schnitt asymmetrisch, so entstehen Fragmente mit entweder 3'- oder 5'-Überhang. Die vier bis acht Basenpaare langen

Erkennungssequenzen sind durch ihre palindromische Struktur gekennzeichnet. Dies bedeutet, dass die Basenabfolge der gegenläufigen Stränge an der betreffenden Stelle, jeweils in 5'-3'-Richtung gelesen, identisch ist. Komplexe Sequenzen kommen sehr selten in identischer Form in unserem Genom vor, sodass Enzyme mit langen Erkennungssequenzen sehr spezifisch an nur wenigen Stellen des Genoms schneiden können. In unseren Versuchen konnten Mutationen dadurch nachgewiesen werden, dass durch die Basenaustausche Erkennungssequenzen für geschickt gewählte Restriktionsenzyme entstehen, während die betreffenden Enzyme den Wildtyp des Gens nicht erkennen und daher auch nicht schneiden.

6.1.12 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmiden aus Bakterien erfolgte mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Zunächst wurde das Kulturmedium zur Vermehrung einer Bakterienkolonie nach mindestens sechzehnständiger Inkubation für drei Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert, sodass am Boden des Behältnisses ein Bakterienpellet entstand. Im Folgenden wurden die Bakterien nach Resuspension (250 µl Qiagen Puffer P1) durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 (Qiagen) lysiert. Durch das enthaltene SDS wird die Zellmembran aufgelöst, während durch Einstellen alkalischer Bedingungen Plasmid-DNA und chromosomale DNA denaturiert werden. Durch Festsetzen der Lysezeit auf maximal 6 Minuten wird gewährleistet, dass möglichst viel Plasmid-DNA und nur wenig chromosomale DNA freigesetzt wird. Anschließende Zugabe von 350 µl Puffer N3 (Qiagen) neutralisiert die Lösung. Die hohe Salzkonzentration des Puffers sorgt für eine Präzipitation von Proteinen, Zelldetritus und chromosomaler DNA, die Plasmid-DNA renaturiert dagegen und bleibt in Lösung. Daher wurde der bei anschließender, zehnminütiger Zentrifugation entstandene Überstand in ein Zentrifugenröhrchen mit Silikagelmembran überführt, der Niederschlag, der sowohl die entstandenen Bakterienfragmente als auch die an der Zellmembran gebundene genomische Bakterien-DNA enthält, dagegen verworfen. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde bei der nachfolgenden Zentrifugation an die Silikagelmembran gebunden. Nach zwei Waschschritten mit Puffer PB (Qiagen) und PE (Qiagen) konnte die Plasmid-DNA in 50 µl Puffer EB (Qiagen) eluiert werden und stand für eine weitere Verwendung zur Verfügung.

6.2 Spezielle Methoden und deren Etablierung

6.2.1 Nachweis der Mutationen Y165C- und G382D

Die Identifikation von Trägern der beiden *MYH*-Hotspotmutationen Y165C und G382D erfolgte nach PCR-Amplifikation der Exons 7 und 13 des *MYH*-Gens bei 352 Patienten durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *MwoI* beziehungsweise *BgIII*. Jeder Patient wurde sowohl auf das Vorliegen der Y165C- als auch der G382D-Variante untersucht. Bei allen Probanden konnte der Status beider Genorte bestimmt werden.

6.2.1.1 Vermehrung der zu analysierenden Genabschnitte

Da der *MYH*-Genotyp der Patienten in der Keimbahn bestimmt werden sollte, erfolgte die Extraktion der DNA aus unauffälliger Kolonschleimhaut (6.1.2.1) oder aus Blutlymphozyten (6.1.2.3) der zu untersuchenden Personen. In der Regel wurden zunächst Verdünnungen der DNA-Stocks im Verhältnis 1:50 mit einem Nukleinsäureanteil von ca. 90 µg/ml hergestellt, indem 10 µl der ursprünglichen DNA-Lösung zu 490 µl sterilem Wasser gegeben wurden. Unter Verwendung der in Abschnitt 5.2.2.2 angegebenen Primer wurden die Exons 7 und 13 sowie die jeweils angrenzenden Abschnitte der benachbarten Introns (Abb. 8 und 9) für jeden Patienten durch eine Standard-PCR (6.1.5) vervielfältigt. Als PCR-Reaktionspuffer wurde Puffer A eingesetzt.

```
cttcctggaggtgagagccaccctagggtaggggaaataggaacgatagagggactgacgggtgatctctttga
cctctgatcctaccacagggaggtgaatcaactctgggctggcctgggctactattctcgtagccggcggtgca
ggagggagctcggaaggaaggggatggcaggagggtaggaaccaggagtcttgggtgtctataatcttgagt
cttgcaactccaatcaggtggttagaggagctagggggccacatgccacgtacagcagagaccctgcagcagctc
```

Abbildung 8: PCR-Produkt zur Analyse des *MYH*-Exons 7

Die erzeugten PCR-Produkte entsprechen der gDNA-Sequenz der Patienten. Die Primer sind fett gedruckt, der grau hinterlegte Bereich entspricht dem Exon 7. Die bei der Y165C-Mutation ausgetauschte Base ist rot markiert (Wildtyp a; Mutante g).

```
ggaacagcctggggcccttggggcccaaattctgctggtgcagaggcccaactcaggtacctggatactgggcgt
ggagggcagtgatgagtaacaagagagaatggagggaaatcgccagctgaggcctgaccctgcctggctgccc
tccctctcaggtctgctggcaggactgtgggagttcccgctccgtgacctgggagccctcagagcagcttcagcgc
aaggccctgctgcaggaactacagcgttgggctggggccctcccagccacgcacctccggcaccttggggaggtg
agtgagcagcggaaatagccaaggatgttggcttttgaggctatatccacaggcctatttg
```

Abbildung 9: PCR-Produkt zur Analyse des *MYH*-Exons 13

Die erzeugten PCR-Produkte entsprechen der gDNA-Sequenz der Patienten. Die Primer sind fett gedruckt, der grau hinterlegte Bereich entspricht dem Exon 13. Die bei der G382D-Mutation ausgetauschte Base ist rot markiert (Wildtyp g; Mutante a).

Anschließend wurden jeweils 10 µl der Produkte auf ein zwei Prozentiges Agarosegel aufgetragen (Abb. 10 und 11) und die Produkte für 30-45 Minuten bei 110 V aufgetrennt (6.1.4). Zeigten sich Banden, die einer Länge von 298 Basenpaaren für Exon 7 beziehungsweise 360 Basenpaaren für Exon 13 entsprachen, so wurden die restlichen 40 µl der PCR-Produkte für die weitere Analyse aufgereinigt und in den nächsten Schritten weiterverarbeitet.

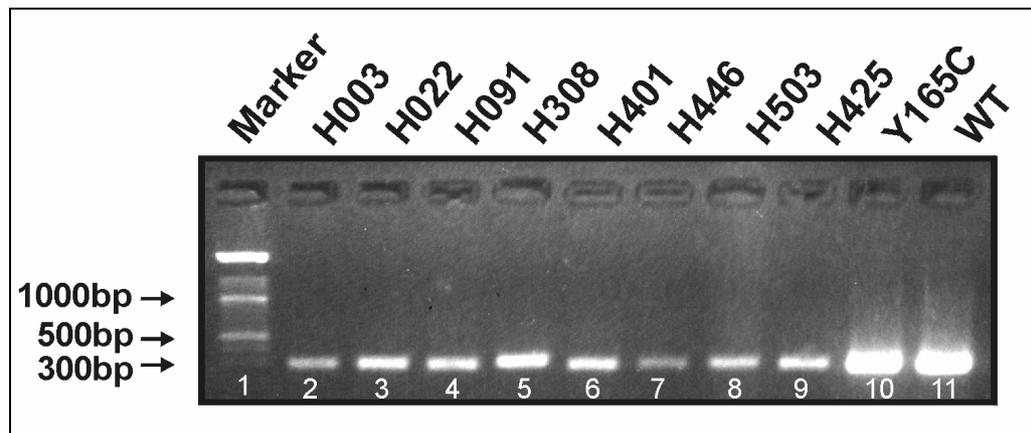


Abbildung 10: Agarosegel der MYH-Exon 7 PCR-Produkte

PCR-Produkte, die die Mutation enthalten (Y165C; Lane 10) beziehungsweise dem Wildtyp (WT; Lane 11) entsprechen, dienten im nachfolgenden Verdau als Kontrollen (siehe auch 6.2.1.2). Die Patientenproben sind auf den Lanes 2-9 aufgetragen. Auf Lane 1 ist der Längenstandard aufgetragen.

6.2.1.2 Herstellung der Positiv- und Negativkontrollen

Zur Herstellung einer Kontrolle, die dem unmutierten Wildtyp entspricht, wurden die Exons 7 und 13 des *MYH*-Gens einer gesunden Person mittels PCR vermehrt, anschließend aufgereinigt und durch Sequenzierung kontrolliert, ob die Basenabfolge dem Wildtyp entspricht. Die PCR-Produkte wurden dann in einen Vektor einkloniert (6.1.9) und Bakterien damit transformiert (6.1.9.2). Jeweils 6 inserttragende Kolonien wurden in einem Flüssigmedium weiter vermehrt und schließlich die Plasmid-DNA durch Minipräparation (6.1.12) isoliert. Durch Direktsequenzierung wurden diese Plasmide kontrolliert und für jedes Exon jeweils ein Klon als Negativkontrolle gewählt. In einer Verdünnung von 1:100 konnten die isolierten Plasmide als Negativkontrolle in den weiteren Reaktionen dienen.

Zur Herstellung der Positivkontrollen wurden 50 ng der Plasmide in die *site-directed-mutagenesis*-Reaktion (6.1.10) eingesetzt. Nach Transformation von Bakterien mit den aus dieser Reaktion hervorgegangenen, mutierten Plasmiden wurden wiederum 6 Kolonien pro Exon entnommen und im Flüssigmedium weiter vermehrt. Nach Plasmidextraktion mittels Minipräparation konnten diese direkt sequenziert werden und diejenigen Klone identifiziert

werden, die das Exon-7-Produkt mit der Y165C-Mutation, beziehungsweise das Exon-13-Produkt mit der G382D Mutation in ihren Plasmiden tragen. Die durch Minipräparation gewonnenen Plasmide wurden dann 1:100 verdünnt und entsprechend den Patientenproben durch eine PCR vermehrt (Abb. 11). Dabei wurden die Exon-7-Wildtyp- und Y165C-Plasmide nur in einer PCR mit Exon 7 spezifischen Primern eingesetzt, und die Exon 13 tragenden Plasmide nur in Reaktionen mit Exon 13 spezifischen Primern verwendet.

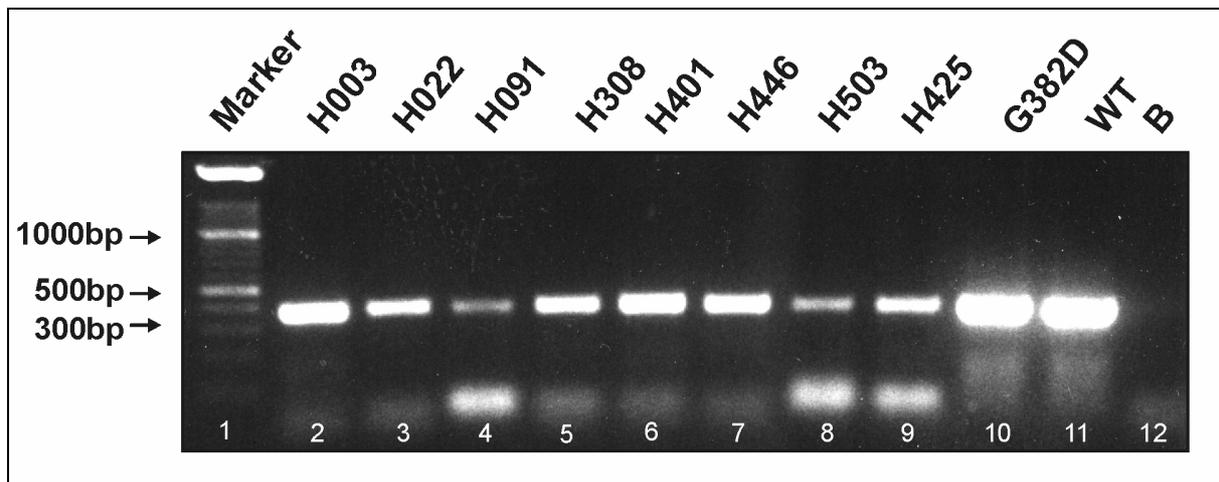


Abbildung 11: Agarosegel der MYH-Exon 13 PCR-Produkte

Die beiden starken Banden rechts außen entsprechen den PCR-Produkten, die durch Einsatz von Exon-13-Wildtyp- und G382D-Plasmiden in die PCR erzeugt wurden (Lanes 10 und 11). Sie dienen im anschließenden Restriktionsverdau als Kontrollen. Die G382D-Plasmide wurden durch *site-directed-mutagenesis* erzeugt. Die Patientenbanden sind anonymisiert beschriftet (Lanes 2-9), die Blindprobe (B; Lane 12) ist negativ. Auf Lane 1 ist der Längenstandard aufgetragen.

6.2.1.3 Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme

Um die Hotspotmutationen Y165C (494 A>G) und G382D (1396 G>A) durch Restriktionsschnitt identifizieren zu können, musste jeweils ein Restriktionsenzym gefunden werden, das nur die Mutante, nicht aber den Wildtyp schneidet (Tab. 8).

Tabelle 8: Charakteristika der Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Mwo*I

An mit N gekennzeichneten Stellen kann eine beliebige Base stehen. Die Pfeile (↑) markieren die Schnittstellen.

Enzym	Erkennungssequenz	Schnittstelle	Temperatur
<i>Mwo</i> I	5'...GCNNNNNNNGC...3' 3'...CGNNNNNNNCG...5'	5'...GCNNNNN↓NNGC...3' 3'...CGNN↓NNNNNCG...5'	60°C
<i>Bgl</i> II	5'...AGATCT...3' 3'...TCTAGA...5'	5'...A↓GATCT...3' 3'...TCTAG↓A...5'	37°C

Die Erkennungssequenz des Enzyms sollte daher nur einmal in dem Amplifikat vorhanden sein und muss den bei der Mutation veränderten Bereich enthalten. Während das Enzym den Wildtyp nicht schneiden kann, entsteht durch Austausch einer einzigen Base an definierter Stelle die Erkennungssequenz des Enzyms. Für das Exon 7 PCR-Produkt zeigte sich das Enzym *Mwo*I, für das Exon 13-Produkt *Bgl*II als geeignet (Abb. 12 und 13).

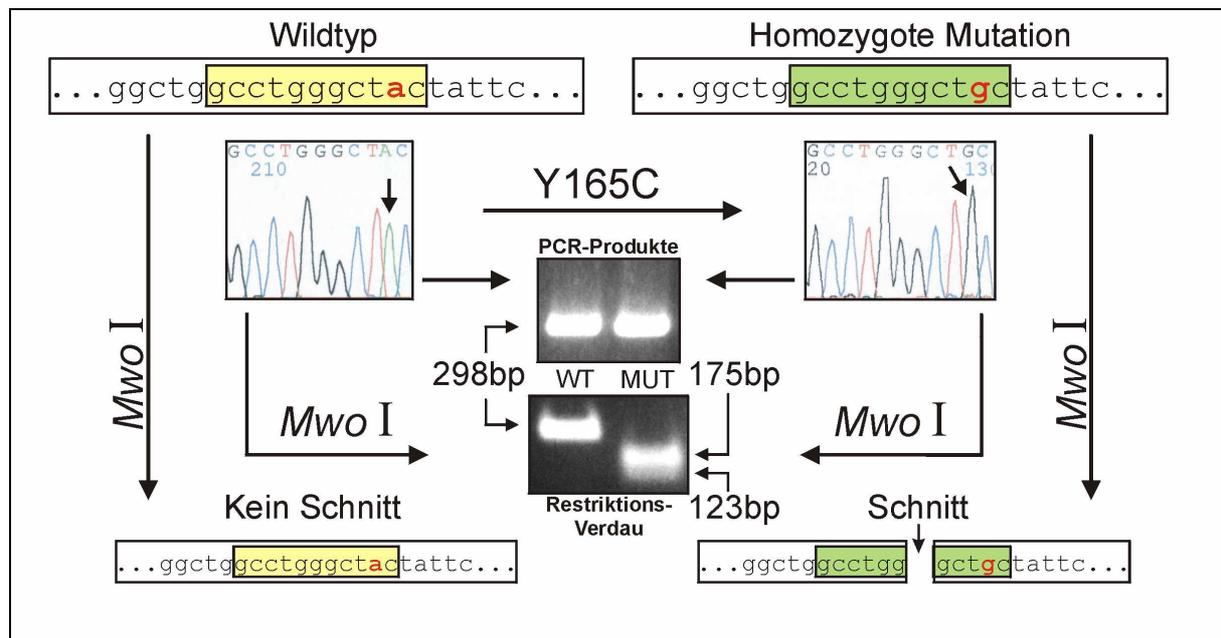


Abbildung 12: Entstehung der Erkennungssequenz von *Mwo*I durch die Y165C Mutation

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Exon 7. Durch die Mutation Y165C (494 A>G) (rot gedruckt und im Sequenzausdruck mit Pfeil markiert) entsteht die Erkennungssequenz für *Mwo*I (grüner Kasten rechts oben), sodass das PCR-Produkt geschnitten werden kann (unten rechts). Der linke Sequenzausdruck entspricht dem Wildtyp (A homozygot), der rechte der Mutante (G homozygot). Im Falle der Mutante liegen nach Restriktionsverdauung zwei kürzere Fragmente vor (unteres Agarosegel rechts), während das Wildtypprodukt nicht geschnitten wird (unteres Agarosegel links).

WT=Wildtyp; MUT=Mutante mit Y165C Mutation

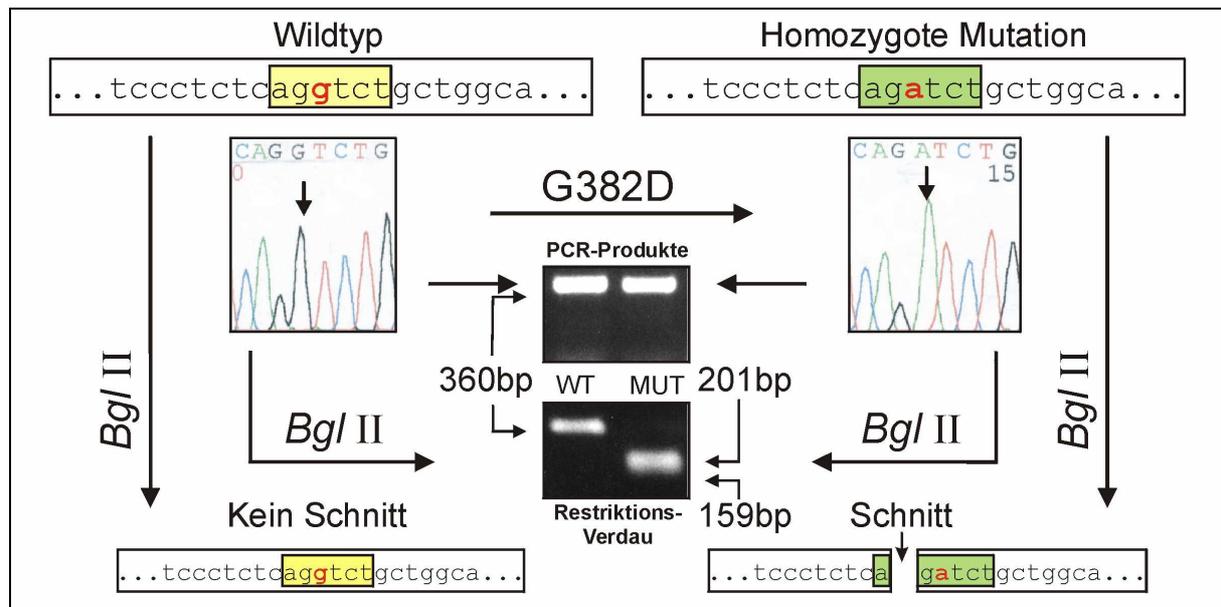


Abbildung 13: Entstehung der Erkennungssequenz von *Bgl*II durch die G382D Mutation

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Exon 13. Durch die Mutation G382D (1396 G>A) (rot gedruckt und im Sequenzdruck mit Pfeil markiert) entsteht die Erkennungssequenz für *Bgl*II (grüner Kasten rechts oben), sodass das PCR-Produkt geschnitten werden kann (unten rechts). Der linke Sequenzdruck entspricht dem Wildtyp (G homozygot), der rechte der Mutante (A homozygot). Im Falle der Mutante liegen nach Restriktionsverdau zwei kürzere Fragmente vor (unteres Agarosegel rechts), während das Wildtypprodukt nicht geschnitten wird (unteres Agarosegel links).

WT=Wildtyp; MUT=Mutante mit G382D Mutation

6.2.1.4 Restriktionsverdau der PCR-Produkte

Zu 10 µl der durch Amplifikation von Patienten-DNA erzeugten, aufgereinigten PCR-Produkte wurden pro Probe 3 µl Wasser, 1,5 µl NEB-Puffer 3 und 0,5 µl des auf das jeweilige Produkt abgestimmten Restriktionsenzym gegeben. Als Kontrollen wurden jeweils 5 µl der aus den Wildtypplasmiden, beziehungsweise den mutierten Plasmiden, gewonnenen PCR-Produkten (6.2.1.2) mit 5 µl Wasser gemischt und ebenfalls mit Wasser, Puffer und Enzym versetzt. Zusätzlich wurde stets ein Gemisch aus jeweils 5 µl Wildtyp- und Mutanten-PCR-Produkt zur Simulation einer heterozygoten Keimbahnmutation mitverdaut (siehe Abbildung 19). Der Ansatz für Exon 7 mit *Mwo*I wurde aufgrund der Anforderungen des Enzyms und seiner Kinetik für drei Stunden bei 60°C in einem Thermocycler inkubiert, während der Ansatz mit *Bgl*II nur für eine Stunde bei 37°C in einem Heizblock inkubiert werden musste.

6.2.1.5 Identifikation der Mutationsträger im Agarosegel

Die mit Restriktionsenzymen behandelten PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und bei 110 V aufgetrennt. Durch Vergleich der Wanderungsstrecken der Patientenproben mit denjenigen der Positiv- und Negativkontrollen war es möglich, homozygote sowie heterozygote oder compound heterozygote Y165C- und G382D-Mutationen zu identifizieren.

Der Exon 7-Wildtyp zeigte dabei nur eine Bande bei 298 Basenpaaren, während die Mutante Banden bei 123 und 175 Basenpaaren aufwies (Abb. 14).

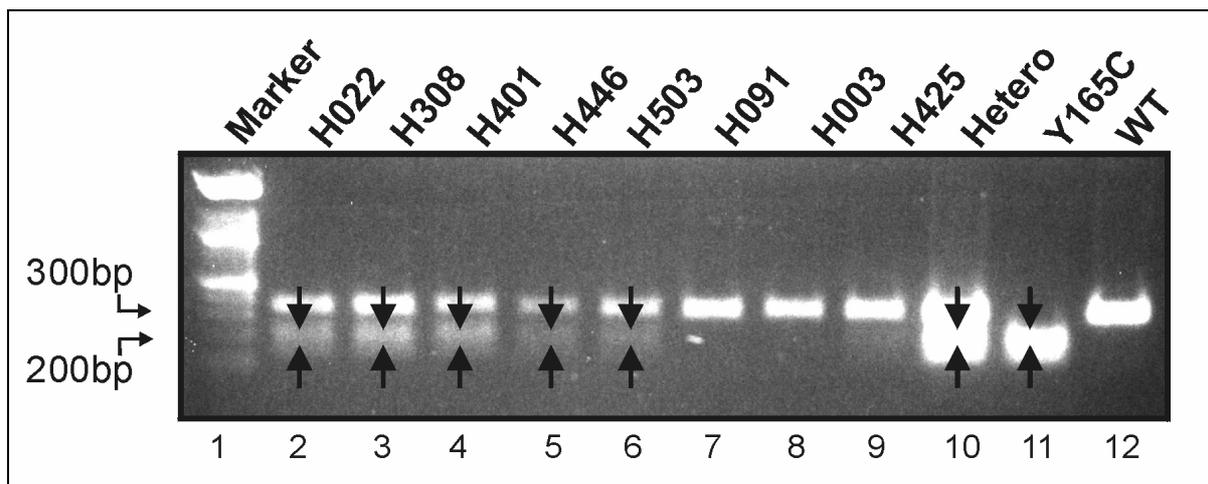


Abbildung 14: Restriktionsverdau der MYH-Exon 7-PCR-Produkte

Dargestellt ist ein Agarosegel nach Restriktionsverdau der Exon 7-PCR-Produkte mehrerer Patienten mit *MwoI*. Die drei ganz rechts aufgetragenen Proben (Lanes 10-12) sind die Kontrollen. Während die Wildtyp-Produkte (WT; Lane 12) nicht geschnitten werden, wird im Falle der Positivkontrolle (Y165C; Lane 11) die gesamte DNA geschnitten (weiter gewanderte, mit Pfeil markierte Bande). Bei Verdau einer Mischung aus mutationstragenden Produkten und Wildtyp-Produkten (Hetero; Lane 10) wird ein Teil der DNA geschnitten (Pfeil) und das Bild einer heterozygoten Mutation simuliert. Die Zusatzbanden, die das Vorliegen einer heterozygoten Y165 Mutation bei den Patientenproben (Lanes 2-6) anzeigen, sind mit Pfeilen markiert. Die Schnittfragmente stellen sich trotz kurzer Auftrennungszeit aufgrund ihrer Größendifferenz andeutungsweise als 2 Banden dar.

Analog dazu entstand beim Exon 13-Wildtyp nur eine Bande bei 360 Basenpaaren, die Mutante weist dagegen aber bei 159 und 201 Basenpaaren Banden auf. Bei heterozygotem Genotyp zeigen sich jeweils alle drei Banden (Abb. 15).

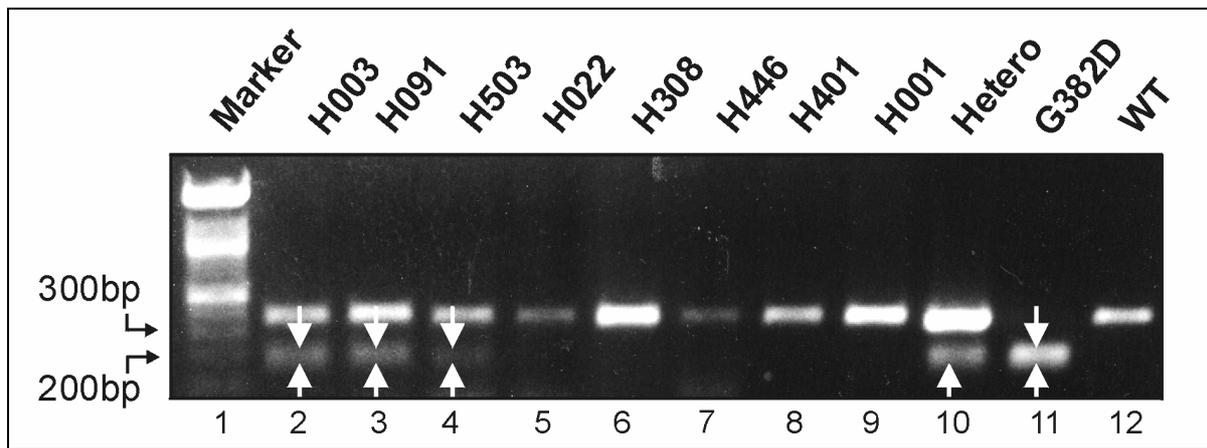


Abbildung 15: Restriktionsverdau der MYH-Exon 13 PCR-Produkte

Dargestellt ist ein Agarosegel nach Restriktionsverdau der Exon 13-PCR-Produkte mehrerer Patienten mit *Bgl*III. Die drei ganz rechts aufgetragenen Proben sind die Kontrollen (Lanes 10-12). Während die Wildtyp-Produkte (WT; Lane 12) nicht geschnitten werden, wird im Falle der Positivkontrolle (G382D; Lane 11) die gesamte DNA geschnitten (weiter gewanderte, mit Pfeil markierte Bande). Bei Verdau einer Mischung aus mutationstragenden Produkten und Wildtyp-Produkten (Hetero; Lane 10) wird ein Teil der DNA geschnitten (Pfeil) und das Bild einer heterozygoten Mutation simuliert. Die Zusatzbanden, die das Vorliegen einer heterozygoten G382D Mutation bei den Patientenproben (Lanes 2-4) anzeigen, sind mit Pfeilen markiert. Die beiden Schnittfragmente stellen sich aufgrund geringer Längendifferenz und kurzer Auftrennungszeit als eine gemeinsame Bande dar.

Bei der Gelelektrophorese der verdauten Proben wurde das Bandenmuster nach 15 Minuten beurteilt. Bei geschnittenen Produkten war bereits nach dieser kurzen Zeit eine zusätzliche, etwas weiter gelaufene, Bande bei gleichzeitigem Abfall der Intensität der Bande der ungeschnittenen DNA erkennbar. Danach wurde das Gel in Abständen von 5-10 Minuten kontrolliert und die Länge der Produkte bestimmt. Während die beiden Schnittfragmente zunächst nur als gemeinsame Bande auffielen, erkannte man bei längerer Auftrennungszeit, dass es sich um zwei verschieden lange Produkte handelte. Die Kontrolle nach 15 Minuten diente vor allem dazu einen heterozygoten Status nicht zu übersehen. Da hierbei lediglich die Hälfte der DNA geschnitten wird, entfällt nur circa ein Viertel der ursprünglich unverdauten DNA-Menge auf die Banden der beiden Schnittfragmente, sodass diese sich bei zu langer Wanderung im Gel nur noch schwach darstellen (Abb. 16).



Abbildung 16: Intensität der DNA-Banden nach Restriktionsverdau im Zeitverlauf

Dargestellt ist ein Restriktionsverdau (*Bgl*III) der MYH-Exon 13 PCR-Produkte eines für die G382D Mutation heterozygoten Patienten. Durch zu lange Auftrennung im Agarosegel kann die heterozygote Mutation leicht übersehen werden

6.2.2 Mutationsanalyse anderer Bereiche des *MYH*-Gens

Zur Identifizierung weiterer Mutationen wurden große Teile des *MYH*-Gens mittels Sequenzierung analysiert.

6.2.2.1 Amplifikation der gewünschten Genabschnitte

Nach DNA-Extraktion aus Kolonschleimhaut oder Blut wurden die Exons 2 bis 14 unter Einsatz spezifischer Primer (5.2.2.2.2) durch PCR vermehrt. Als PCR-Reaktionspuffer wurde Puffer B eingesetzt.

Durch die geringe Länge der Introns 3-13 wurden die Exons 3-5, 6-8, 9-11 sowie 12-14 mit dazwischenliegenden Introns als jeweils drei Exons enthaltende Fragmente vermehrt (Abb. 17).

<p>A: 598 Basenpaar Produkt der Exons 3-5</p> <p><i>ccacaggctgctgtgtccaagaccctgatgcacagcctgtgcagggatgattgctgagtgctcctggggcccccagcaggcctggccaggcagccggaagaggtggtatgacagccctctgtctcctcacaaccatctattcagagacgtagctgaagtccacagcctcccgagggagcctgctaagctggtacgaccaagagaaaacgggacctaccatgggagaagacgggttaggcaggcgaggagcagggacagtgggtgggaggcaggcaccagcccctccacctaactcctcatctggggttgcatgacaggcagaaagatgagatggacctggacagggcggccatagctggtcagtacatctcctgagagcagggccactttgctcagagcccttgggtctggggctgtggggcaggtaggggcaggtcagcagtgctcctatgccaacccctttccccagctggtgctcagaggtcatgctgc agcagacca ggtgccactgtgatcaact actataccggatggatgcaggtgactccaggggaggaagggatcatgggtcagaccccagatgagagcctc</i></p>
<p>B: 579 Basenpaar Produkt der Exons 6-8</p> <p><i>ctttggggtgggtgtagagaaggcttccctaccacctcacccttgacctgtctctttctgctgctgtg gctatagaagtggcctacactgcaggacctggccagtgcttccctggaggtgagagccaccctagggtaggggaaataggaacgatagagggactgacgggtgatctctttgacctctgatcctaccacagggaggtgaatcaactctgggctggcctgggctactatctctgctggccggcggctgcaggagggagctcggaaggtaaagggatggcaggaggttaggaacccaggagctctgggtgtcttataactctgagtcctgcactccaatcaggtggttagaggagctagggggccacatgccacgtacagagaccctgcagcagctcctgctggcgtggggcgctacacagctggggccattgctctatcgctttggccaggtgatctcacagcccaaccctcttggctgctgcccagcctccttcccccagccaggttaactctttggccctctgtgcccaggaaccgggtgtgtggatggcaactgag</i></p>
<p>C: 720 Basenpaar Produkt der Exons 9-11</p> <p><i>gtgccagcctccttccctcccagcccaggcctaactctttggccctctgtgcccaggcaaccgggtggtggatggcaactgagcaggggtgctgtgcccgtgctcagagccattggtgctgatcccagcagcaccctgtttcccagcagctctggttaggatgttgggtaacaagggctctcaggggtgtctgcaaaaggagctctgcttccacagcagtgcttccctcttttaggggtctagcccagcagctggtggaccagcccggccaggagattcaacaagcagccatggagctagggggccacagtggtgtaacccacagcgcactgtgcagccagtgccctgtggagagcctgtgcccgggacgcgcagagtaagcctactggggaagggcagtgagaagctcctaaggagtgacctgcccctatgacactcaaccctgtgctctcaggtggagcaggaacagctcttagcctcagggagcctgtcgggcagctcctgacgtggaggagtggtgagcaccaaactagccccaccccaaccctcctggcccagtcagaagcccattccagttct</i></p>
<p>D: 842 Basenpaar Produkt der Exons 12-14</p> <p><i>cttaggtggccctaaagccctcttggtgagtagggttcggggatctccgttcccagctcccaacactggacagtgccacctgtgctgctgcttccctggagccctgggaccagaccctgggagtggtcaacttcccagaaaggccagccgcaagccccagggaggagagctctgccacctgtgtctggaacagcctggggccctggggcccaattctgctggtgcagagggcccaactcaggtacctggatactggcgtggaggcagtgggagtgaagtaacaagagagaatggaggaatcggcagctgagggcctgacccctgctggctgcccctcctctcaggtctgctggcaggaactgtgggagttcccgctcogtgaactgggagccctcagagcagcttcagcgcaaggccctgctgcaggaactacagcgttgggctggggccctccagccacgcaacctccggcaccctggggaggttaagtgagcagcgggaatagccaaggatgttggcttttgaggctatatccacagggcctatttgaacccttgaccttctccaggtgtgccaaccttctctcacatcaagctgacatataagtatatgggctggccttggagggcagaccctcagtgaccacogtaccaccaggtgctcgtgctgagcagcagggaggaatttcacaccgagctgttccaccggccatgaaaaaggcactacctttggtgctttgtgtgtacttcttgtgtttcctacatgttctacatgaatatactactgtgtaaacaggaaaaaagcattttttttgagacggagaatcgct</i></p>

Abbildung 17: PCR-Amplifikation der Exons 3-14

Die 12 Exons wurden samt dazwischenliegenden Intronabschnitten in vier Fragmenten vermehrt. A: Exon 3-5; B: Exon 6-8; C: Exon 9-11; D: Exon 12-14. Die Primer sind fett und kursiv hervorgehoben. Exons sind grau hinterlegt. Die Sequenzen entsprechen der gDNA.

Die Exon 1-Formen 1 α , 1 β , 1 γ und 2 wurden wegen den relativ großen Introns 1 und 2 einzeln amplifiziert (Abb. 18 und 19). Durch dieses Vorgehen konnte nahezu das gesamte *MYH*-Gen mit nur sechs PCR-Reaktionen analysiert werden. Neben den erwähnten Exons wurden die Introns 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13 komplett amplifiziert. Zusätzlich konnten jeweils

Anfang und Ende der Introns 2, 5, 8, 11 und der Anfang des Exons 14 amplifiziert und auf Auffälligkeiten untersucht werden. Nicht untersucht wurden die Exons 15 und 16.

```
ctgcgggagctgaaactgcgccatcgctcaactgtcggcggccatgacaccgctcgtctcccgcctgagtcgctctgtgggtacgctggacttgcgg
tccgctctcctggcgggttcaggcagtcggggatggggcggggtctcgcgctcgggtcgcgatgggtcgaacttccggtcagacgtcccgggt
ccggcgcggggaaggcagcctggcgcgcgctaattgcctattggcctgtgctgcgggtcgcagcccgggtggaccgagccacgcccctgga
gtgcccgggaaagccgggcccgcgctagagctcgcgggaggaatctttctctcctgctctcgcggcgggaaacgcggggcctccggttctctgctgt
cttcatcagcgtgggcccgggtaggggtagtgggggtggctgggtttgggcttccagagaaggtgacgctgacctgagctgagcttaaagcac
gccaggagtta
```

Abbildung 18: PCR-Amplifikation der *MYH*-Exon 1 Formen

Das Exon 1 α ist dunkel, das Exon 1 β hell unterlegt. Das Exon 1 γ liegt dazwischen. Die Primerbereiche sind fett und kursiv dargestellt. Das Startkodon ist rot gedruckt. Das betreffende gDNA-Fragment umfasst 482 Basenpaare.

```
ccttggaaggcctcaaaattggcctcattgtgactgactgctttggctgggtcttttggtttcaggccatcatgaggaagccacgagcagccg
tgggaagtgggtcacaggaagcagccagccaggaaggaggcagaagcatgctaagaacaacagtcaggccaagcctctcgcctgtgatgg
taaggaactaggttgggcccaggctcattggcctgaaaggcagattcagg
```

Abbildung 19: PCR-Amplifikation des *MYH*-Exons 2

Dargestellt ist die gDNA-Sequenz des 241 bp langen Fragments. Die Primer sind fett und kursiv hervorgehoben, das Exon 2 ist grau hinterlegt.

6.2.2.2 Auftrennung und Aufreinigung der PCR-Produkte

Jeweils 10 μ l des PCR-Ansatzes wurden im Agarosegel aufgetrennt und die Länge des entstandenen Produkts bestimmt (Abb. 20). Die restlichen 40 μ l des Ansatzes wurden mit Hilfe des *PCR-Purification Kit* aufgereinigt und ein Teil davon in die nachfolgende Sequenzierreaktion eingesetzt.

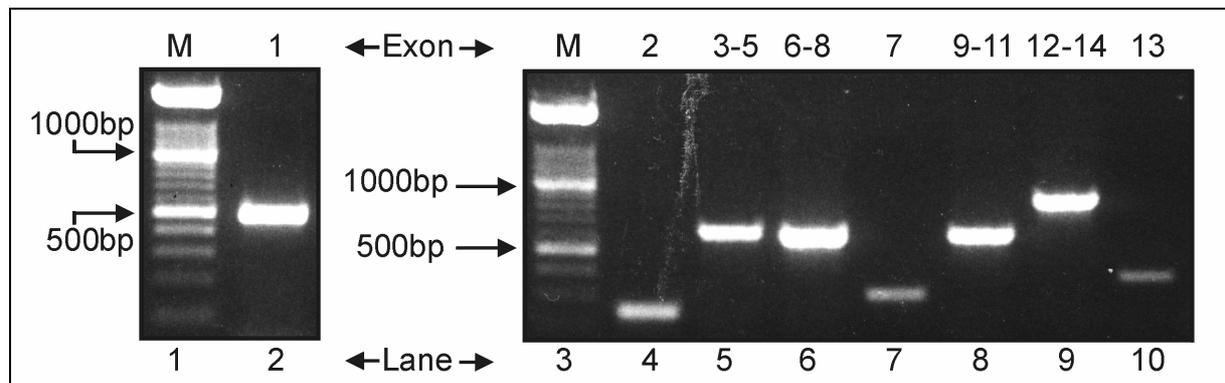


Abbildung 20: Agarosegel der PCR-Produkte der *MYH*-Exons 1-14

Die oberen Zahlen geben an, welchen Exons das jeweilige Produkt entspricht. Der Marker (M) dient der Größenbestimmung der Fragmente. Im rechten Teil der Abbildung sind neben den großen PCR-Produkten zur Analyse weitere Teile von *MYH* (Lanes 2, 4, 5, 6, 8, 9; siehe Abb. 17) auch die kleineren Fragmente (Lanes 7 und 10) zur Identifizierung der Hotspotmutationen (siehe Abb. 8 und 9) durch Restriktionsverdau aufgetragen.

6.2.2.3 Sequenzierungsreaktion und Analyse der Basenabfolge

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in einen Sequenzierungs-PCR-Ansatz gegeben und die Sequenzierungsreaktion in einem Thermocycler nach dem in Abschnitt 6.1.8.1 beschriebenen Temperaturschema durchgeführt. Nach der Aufreinigung konnte der gesamte Ansatz in einen Sequenzierautomaten gegeben und die Basensequenz automatisch bestimmt werden.

6.2.3 MYH-Transkriptanalyse

Um beurteilen zu können, ob verschiedene Varianten unklarer Pathogenität im Intronbereich des *MYH*-Gens das Prä-mRNA-Spleißen beeinflussen können, wurden die mRNA-Abschnitte der Exons 1 bis maximal 7 bei den betroffenen Patienten analysiert und mit den mRNAs gesunder Probanden verglichen. Hierzu wurde durch reverse Transkription (6.1.6) von der mRNA die entsprechende cDNA erzeugt und analysiert.

6.2.3.1 Herstellung und Vermehrung von cDNA

Von der aus frischem Blut isolierten Gesamt-RNA (6.1.2.4) wurde durch Reverse Transkription unter Einsatz von Oligo-dt-Primern (5.2.2.2.3) gezielt die mRNA in cDNA umgeschrieben (6.1.6.1). Anschließend wurden die zu untersuchenden Abschnitte der mRNA mittels RT-PCR amplifiziert. Als Reaktionspuffer wurde Puffer C eingesetzt. Um sowohl die α -Transkripte als auch die β -Transkripte beurteilen zu können, die sich in ihrer 5'-Sequenz und damit ihrem ersten Exon unterscheiden, wurden zwei verschiedene Forward-Primer für die RT-PCR verwendet (5.2.2.2.4). Durch Nutzung von drei verschiedenen Reverse-Primern (5.2.2.2.4) wurden Produkte unterschiedlicher Länge hergestellt. Nachdem eine Produktbildung über Nachweis von DNA-Banden im Agarosegel sichergestellt werden konnte, wurden die verbliebenen 40 μ l PCR-Ansatz mit dem *PCR-Purification-Kit* aufgereinigt und in den nachfolgenden Schritten weiterverarbeitet.

6.2.3.2 Gezielte Vermehrung und Analyse einzelner Transkripte

Eine Sequenzierung der in 6.2.3.1 erzeugten PCR-Produkte würde aufgrund des alternativen Spleißens und der damit verbundenen Bildung verschiedenster mRNAs vielfach überlagerte und daher nicht auswertbare Signale ergeben. Deshalb mussten die von den unterschiedlichen mRNAs abgeschriebenen cDNAs einzeln in Bakterien vermehrt werden, sodass dann jeweils nur eine der alternativen Formen in vielfacher Kopie vorlag und sequenziert werden konnte. Hierzu wurden die aufgereinigten PCR-Produkte mittels TA-Klonierung in ein Plasmid integriert. Anschließend wurden Bakterien mit dem Plasmidansatz transformiert, auf

Selektivagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C vermehrt. Inserttragende Kolonien wurden mittels Blau-Weiß-Screening ausgewählt und in Flüssigmedium übertragen.

Nach Vermehrung einzelner Kolonien im Flüssigmedium wurden die Plasmide durch Minipräparation isoliert. Im nächsten Schritt wurden diese direkt in eine Sequenzierungs-PCR eingesetzt und dann in einem Sequenzierautomat analysiert.

6.2.4 Analyse von MYH-Intron 1

Das gesamte 5708 Basenpaare lange Intron 1 zwischen Exon 1 α und Exon 2 wurde auf Varianten untersucht, die möglicherweise Spleißfehler verursachen können.

6.2.4.1 Amplifikation des gewünschten Genabschnitts

Aufgrund der Länge von Intron 1 wurde der betreffende Genabschnitt in mehrere überlappende Fragmente unterteilt (Tab. 9). Diese wurden jeweils mit Hilfe eines für das jeweilige Fragment spezifischen Primerpaars (5.2.2.2.4) mittels Standard-PCR in einem Thermocycler amplifiziert. Der Einsatz von Puffer C ergab hierbei die stärksten Produkte.

Tabelle 9: PCR-Fragmente zur Analyse des MYH-Introns 1

Die Fragmente 1 und 6 mussten zur besseren Sequenzierbarkeit aufgrund ihrer Länge in jeweils zwei Fragmente unterteilt werden.

Fragment:	1A	1B	2	3	4	5	6A	6B
Größe:	559bp	468bp	952bp	1000bp	990bp	968bp	672bp	596bp

6.2.4.2 Analyse der Basenabfolge

Jeweils 10 μ l der generierten PCR-Produkte (6.2.4.1) wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Länge der Produkte bestimmt. Bei Vorliegen geeigneter Produkte wurden die restlichen 40 μ l mit Hilfe des *PCR-Purification Kits* aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in einen Sequenzierungs-PCR-Ansatz gegeben. Nach Aufreinigen der in der nachfolgenden Sequenzierungsreaktion entstandenen Produkte konnte die Basensequenz der Fragmente in einem Sequenzierautomat automatisch ermittelt werden. Aufgrund abfallender Signale im Verlauf eines sequenzierten Produkts können immer nur die ersten 500 bis 600 Basenpaare eines PCR-Produktes durch Sequenzieren sicher beurteilt werden. Deshalb wurden die deutlich längeren Fragmente jeweils sowohl in Sense- als auch in Antisense-Richtung sequenziert. Unter Einsatz des Forward-Primers konnte die Basenabfolge von 5' nach 3' und unter Einsatz des Reverse-Primers von 3' nach 5' bestimmt werden. Durch Zusammenfassung beider Informationen konnte so die Basenabfolge des gesamten Fragmentes bestimmt werden. Varianten konnten durch Vergleich der entsprechenden

Patientensequenz mit der in Datenbanken beschriebenen Intron 1-Sequenz identifiziert werden. Bei den Fragmenten 2-4 mussten zum vollständigen Sequenzieren aufgrund abfallender Signalstärken neben den zur Amplifikation verwendeten Primern die in Abschnitt 5.2.2.2.5 angegebenen Primer eingesetzt werden.

7 Ergebnisse

7.1 Screening der beiden Hotspotmutationen Y165C und G382D

Es wurde die Häufigkeit der beiden Hotspotmutationen Y165C und G382D in den verschiedenen Patientengruppen mit der in 6.2.1 beschriebenen Methode bestimmt.

7.1.1 Vorliegen der Mutationen in der gesunden Normalbevölkerung

7.1.1.1 Charakterisierung der Patientengruppe

Es wurden 116 Patienten untersucht, die an keiner Darmerkrankung litten (Tab. 10). Die Koloskopien wurden hauptsächlich zur Krebsvorsorge durchgeführt.

Tabelle 10: Charakteristika der gesunden Probanden

Patienten- anzahl	Männer	Frauen	Alter (Jahre)	Altersrange (Jahre)
116	54	62	54,7±16,2	18-83

7.1.1.2 Häufigkeit mono- und biallelischer Mutationen

Eine heterozygote Y165C-Mutation konnte bei zwei Patientinnen (H308; H446) identifiziert werden. Es wurde keine G382D-Mutation nachgewiesen. Keiner der Patienten zeigte eine homozygote oder compound heterozygote Mutation. Die beiden betroffenen Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 54 Jahre (H308) beziehungsweise 77 Jahre (H446) alt und wiesen drei beziehungsweise zwei hyperplastische Polypen auf.

Die Allelhäufigkeit für Y165C lag bei zwei pro 232 Allele. Somit wiesen 0,86% der untersuchten Allele diese Mutation auf. Die Allelfrequenz für G382D konnte in der Normalbevölkerung nicht bestimmt werden.

7.1.2 Vorliegen der Mutationen bei Adenom- und Karzinompatienten

7.1.2.1 Charakterisierung der Patientengruppe

131 Patienten wiesen kolorektale Adenome oder Karzinome auf (Tab. 11). Die Patientengruppe kann in Patienten mit kolorektalen Adenomen, Patienten mit kolorektalen Karzinomen ohne zusätzliche Adenome sowie Patienten mit Adenomen und Karzinomen unterteilt werden.

Tabelle 11: Patienten mit kolorektalen Adenomen und/oder Karzinomen

Diagnose	Patienten-anzahl	Männer	Frauen	Alter (Jahre)	Altersrange (Jahre)
<i>Adenome</i>	75	49	26	64,3±10,1	39-86
<i>KRK</i>	23	17	6	63,7±13,7	41-81
<i>Adenome+KRK</i>	33	23	10	69,8±9,6	47-82
Gesamt	131	89	42	65,5±10,9	39-86

KRK=Kolorektales Karzinom

Insgesamt konnten bei 108 Patienten mit Adenomen 506 Adenome geborgen und histologisch gesichert werden. Dabei wurden 300 tubuläre (59,3%), 200 tubulovillöse (39,5%) und lediglich 6 villöse (1,2%) Adenome diagnostiziert. Die Mehrzahl war unter 5 mm groß und wies leichte Dysplasien auf (Tab. 12).

Tabelle 12: Größe und Dysplasiegrad aller 506 histologisch untersuchten Adenome

Ausprägung	Adenomgröße			Dysplasiegrad			Gesamt
	<i><5mm</i>	<i>5-10mm</i>	<i>>10mm</i>	<i>leicht</i>	<i>mittel</i>	<i>schwer</i>	
Anzahl	256	158	92	478	11	17	506
(%)	(50,6)	(31,2)	(18,2)	(94,5)	(2,2)	(3,3)	(100)

Die Adenome waren relativ gleichmäßig im gesamten Kolorektum verteilt. Distal der linken Flexur lagen 65,1%, proximal davon 34,9% der Adenome (Tab. 13).

Tabelle 13: Lokalisation der 506 identifizierten Adenome

Lokalisation	Rektum	C. sigmoideum	C. descendens	C. transversum	Zökum+C. ascendens	Gesamt
Anzahl	65	121	143	69	108	506
(%)	(12,9)	(23,9)	(28,3)	(13,6)	(21,3)	(100)

Die 108 Patienten mit Adenomen (Patienten mit Adenomen sowie Patienten mit Adenomen und Karzinom) können hinsichtlich der Polypenzahl in weitere Untergruppen unterteilt werden. So entfallen 308 Adenome auf 100 Patienten mit 1-14 Adenomen und 198 Polypen auf 8 Patienten mit mehr als 15 Adenomen.

Von den 198 Adenomen der 8 Patienten mit mehr als 15 Adenomen wiesen 151 eine tubuläre (76,3%) und 47 eine tubulovillöse (23,7%) Wuchsform auf. Bei den 100 Patienten mit weniger als 15 Adenomen waren von insgesamt 308 Adenomen 149 tubuläre (48,4%), 153 tubulovillöse (49,7%) und 6 villöse (1,9%) Adenome. Hinsichtlich der Größe und des Dysplasiegrades unterschieden sich die Polypen der beiden Gruppen nicht relevant (Tab. 14).

Tabelle 14: Größe und Dysplasiegrad in Abhängigkeit von der Adenomzahl

	Adenomgröße			Dysplasiegrad			Gesamt
	<5 mm	5-10 mm	>10 mm	leicht	mittel	schwer	
Patienten mit ≥15 Adenomen (n=8)	100 (50,5%)	65 (32,8%)	33 (16,7%)	185 (93,4%)	9 (4,6%)	4 (2,0%)	198
Patienten mit <15 Adenomen (n=100)	156 (50,6%)	93 (30,2%)	59 (19,2%)	293 (95,1%)	2 (0,7%)	13 (4,2%)	308

7.1.2.2 Biallelischer MYH-Mutationsstatus

7.1.2.2.1 Häufigkeit biallelischer MYH-Mutationen

In der Gruppe von Patienten mit ausschließlich kolorektalen Adenomen und auch den Patienten mit Karzinomen aber ohne zusätzliche Adenome wurde kein Patient mit biallelischer Mutation identifiziert.

Allerdings wies ein Patient aus der Gruppe mit Adenomen und Karzinom (H503) sowohl eine heterozygote Y165C- als auch eine heterozygote G382D-Mutation auf, sodass von einem compound-heterozygoten Genotyp mit biallelischer Gen-Inaktivierung ausgegangen werden kann. Hierbei handelte sich um einen von 8 Patienten mit über 15 kolorektalen Adenomen. Im Alter von 44 Jahren wurde bei dem Patienten eine Sigmaresektion mit Descendorektostomie und Anlage eines protektiven Anus praeters bei perforierter Sigmadivertikulitis durchgeführt. Im Rahmen der histologischen Aufarbeitung des Resektats wurde zufällig ein Sigmakarzinom (pT1, N0, M0) auf dem Boden eines tubulovillösen Adenoms diagnostiziert. Bei Nachsorgekoloskopien wurden zwischen dem 50. und 57. Lebensjahr (November 2000 bis März 2008) 107 Adenome in den verbliebenen Kolon- und Rektumabschnitten entfernt, sodass hier von einer MYH-assoziierten Polyposis (MAP) auszugehen ist.

7.1.2.2.2 Der Patient H503 im Vergleich mit anderen Adenompatienten

Um herauszufinden, ob sich die bei MAP entstehenden Adenome von Adenomen der Nicht-MAP-Patienten unterscheiden, wurden die Charakteristika der geborgenen und histologisch gesicherten Adenome des Patienten H503 mit denjenigen anderer Adenompatienten verglichen.

Aufgrund der wiederholten endoskopischen Polypektomien bei jeweils hohen Polypenzahlen konnten nicht für alle 107 abgetragenen Adenome sämtliche Parameter (Lokalisation, Größe, Wuchsform, Dysplasiegrad) erfasst werden. Die vollständig charakterisierten Adenome können jedoch als repräsentativ für die Gesamtheit der Adenome dieses Patienten angesehen werden. Die seit dem Jahr 2007 bei dem Patienten H503 abgetragenen Adenome wurden im Gegensatz zu den zuvor entfernten Adenomen sowie den Adenomen der übrigen Patienten histologisch nach der Wien Klassifikation (Schlemper et al., 2000) beurteilt, sodass diese in den Ausführungen dieses Kapitels wegen fehlender Vergleichbarkeit nicht berücksichtigt werden konnten.

Von den 67 bis 2007 abgetragenen Polypen konnten von 37 sämtliche Charakteristika erfasst werden. Hiervon waren 24% tubulovillöse und 76% tubuläre Adenome. Auch bei den anderen von uns untersuchten Adenompatienten dominierten tubuläre Formen (58%). Tubulovillöse (40,7%) und villöse (1,3%) Adenome kamen deutlich seltener vor.

Die Adenome des MAP-Patienten H503 zeigten jedoch deutlich häufiger höhergradige Dysplasien (Tab. 15). Während bei sporadischen Adenomen solche höhergradigen Dysplasien meist erst in größeren Polypen beobachtet werden, wiesen bei dem Patienten H503 häufig kleine Adenome bereits mittlere oder schwere Dysplasien auf. So waren fünf der neun Adenome des Patienten H503 mit mittleren oder schweren Dysplasien kleiner als 5 mm, drei 5-10 mm groß und nur eines über 10 mm groß. Dagegen waren bei den als Vergleichsgruppe gewählten 107 Adenompatienten 15 der 19 Adenome mit mittleren oder schweren Dysplasien größer als 10 mm, vier waren 5-10 mm groß, keines kleiner als 5 mm.

Tabelle 15: Adenomgröße und Dysplasiegrad bei biallelischer MYH-Mutation

Größe und Dysplasiegrad der Adenome des Patienten H503 sind den histologischen Kriterien der Adenome der 100 Patienten mit weniger als 15 Adenomen und der 7 Patienten mit mindestens 15 Adenomen, jeweils ohne nachweisbare biallelische MYH-Hotspotmutation, gegenübergestellt. Bei Patient H503 fällt ein höherer Anteil von Adenomen mit mittlerer oder schwerer Dysplasie bei vorrangig <5mm großen Adenomen auf.

	Adenomgröße			Dysplasiegrad			Gesamt
	<5 mm	5-10 mm	>10 mm	leicht	mittel	schwer	
Patient H503	31 (83,8%)	3 (8,1%)	3 (8,1%)	28 (75,7%)	7 (18,9%)	2 (5,4%)	37
Patienten mit ≥15 Adenomen (n=7)	69 (42,9%)	62 (38,5%)	30 (18,6%)	157 (97,6%)	2 (1,2%)	2 (1,2%)	161
Patienten mit <15 Adenomen (n=100)	156 (50,6%)	93 (30,2%)	59 (19,2%)	293 (95,1%)	2 (0,7%)	13 (4,2%)	308

Bei dem Patienten H503 wurde sehr früh im Krankheitsverlauf eine Sigmaresektion mit nachfolgender Descendorektostomie wegen perforierter Sigmadivertikulitis durchgeführt. In der Folgezeit zeigte sich eine Häufung der Adenome im Kolon ascendens. Die anderen verbliebenen Darmabschnitte waren deutlich seltener betroffen (Tab. 16).

Tabelle 16: Adenomverteilung im Kolon bei biallelischer MYH-Mutation

Vergleich der Lokalisation der Adenome im Kolorektum des Patienten H503 (biallelischer Mutationsstatus) mit derjenigen der Adenome von 107 Patienten ohne biallelische MYH-Hotspotmutation.

Lokalisation	Rektum	C. sigmoideum	C. descendens	C. transversum	Zökum+C. ascendens	Gesamt
Patient H503	1 (2,7%)	1 (2,7%)	0 (0%)	6 (16,2%)	29 (78,4%)	37
Patienten mit ≥15 Adenomen (n=7)	17 (10,6%)	28 (17,4%)	48 (29,8%)	28 (17,4%)	40 (24,8%)	161
Patienten mit <15 Adenomen (n=100)	47 (15,3%)	92 (29,9%)	95 (30,8%)	35 (11,3%)	39 (12,7%)	308

In den Koloskopiebefunden des Patienten H503 wird neben der Häufung im C. ascendens auf eine bevorzugt flache Wuchsform der Adenome hingewiesen.

Der Patient H503 war bei Diagnose seines Sigmakarzinoms (T1, N0, M0) 44 Jahre alt. Bei zwei der Patienten mit über 15 Adenomen (64 und 75 Jahre), aber ohne biallelische MYH-Mutation, wurde ebenfalls ein Karzinom diagnostiziert. Die betroffenen Patienten waren im Vergleich dazu aber bereits 64 beziehungsweise 75 Jahre alt.

7.1.2.3 Monoallelischer *MYH*-Mutationsstatus

In der Patientengruppe mit kolorektalen Adenomen konnte bei einem Patienten (H022) eine heterozygote Y165C-Mutation nachgewiesen werden. In der Patientengruppe mit KRK wurde keine *MYH*-Mutation gefunden. Allerdings wurde in der Gruppe mit Adenomen und Karzinom bei einem Patienten (H003) eine heterozygote G382D-Mutation detektiert. Bei Patient H003 wurden 4 Adenome gefunden, bei Patient H022 wurden bislang 19 Adenome diagnostiziert. Der Patient H003 war bei Auftreten der ersten Adenome 66 Jahre alt, der Patient H003 bei der simultanen Diagnose von Adenomen und einem Karzinom bereits 80 Jahre alt.

7.1.3 Nachweis von Y65C und G382D bei CED-Patienten

7.1.3.1 Charakterisierung der Patientengruppen

Es wurden 72 Patienten mit Morbus Crohn und 20 Patienten mit Colitis ulcerosa untersucht (Tab. 17).

Tabelle 17: Charakteristika der Patienten mit CED

Gruppe	Patientenanzahl	Männer	Frauen	Alter (Jahre)	Altersrange (Jahre)
M. Crohn	72	28	44	37,9±12,7	18-73
C. ulcerosa	20	11	9	45,9±21,0	18-74
Gesamt	92	39	53	39,6±15,1	18-74

7.1.3.2 Häufigkeit monoallelischer und biallelischer Mutationen

Keiner der Patienten mit CED wies eine biallelische Mutation auf. Eine Patientin (H401) mit Morbus Crohn zeigte eine heterozygote Y165C Mutation, eine weitere (H091) eine heterozygote G382D Mutation. Es wurde keine *MYH*-Mutation bei Patienten mit Colitis ulcerosa gefunden. Die Heterozygotenfrequenz lag bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung mit 2,2% im Bereich derjenigen von gesunden Probanden (7.1.1). Die Allelfrequenz für die beiden Hotspot-Mutationen betrug in der CED-Gruppe jeweils 0,5%.

7.1.4 Mutationsnachweis bei Patienten mit sonstigen Erkrankungen

7.1.4.1 Charakterisierung der Patientengruppe

Es wurden 13 Patienten (5 Männer; 8 Frauen; Alter $46,6 \pm 21,3$ Jahre; Altersrange 18-78 Jahre) mit selteneren Darmerkrankungen zu einer weiteren Gruppe zusammengefasst. Vier davon litten an einer APC-positiven FAP. Fünf Patienten hatten eine unspezifische Darmentzündung, zwei Patienten ein Lymphom des Darmes und jeweils ein Patient einen Morbus Hirschsprung beziehungsweise ein Turcot-Syndrom.

5.1.4.2 Häufigkeit monoallelischer und biallelischer Mutationen

In dieser Patientengruppe wurde keine der beiden Hotspotmutationen Y165C und G382D im *MYH*-Gen nachgewiesen.

7.1.5 Übersicht über die Analyse der Hotspotmutationen

Insgesamt konnten im Gesamtkollektiv (n=352) sieben Mutationsträger mit insgesamt 8 Hotspotmutationen (5x Y165C; 3x G382D) identifiziert werden (Tab. 18; siehe auch Abb. 14 und 15). Dabei war ein Patient mit über 15 Adenomen compound heterozygot für Y165C und G382D. Keiner der Patienten hatte eine homozygote Mutation.

Tabelle 18: Übersicht über die Y165C- und G382D-Mutationsanalyse im Gesamtkollektiv
Angegeben ist das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose der *MYH*-Mutation.

Patient	Patienten- gruppe	Geschlecht	Alter (Jahre)	Y165C (heterozygot)	G382D (heterozygot)
H503	Adenome + KRK	M	50	+	+
H003	Adenome + KRK	M	82	-	+
H022	Adenome	M	72	+	-
H091	Morbus Crohn	W	53	-	+
H401	Morbus Crohn	W	59	+	-
H308	Normalkollektiv	W	55	+	-
H446	Normalkollektiv	W	78	+	-

7.1.6 Bestätigung der positiven Ergebnisse

Von fünf der sieben Patienten mit *MYH*-Hotspotmutation konnte zu einem späteren Zeitpunkt eine zusätzliche Blutprobe entnommen werden. Bei allen fünf Patienten konnten die *MYH*-Mutationen in der gewonnenen Lymphozyten-DNA durch Sequenzieren der Exons 7 und 13 bestätigt werden. Die Patientin H446 lehnte eine Blutentnahme ab, während der Patient H003 bereits verstorben war. Bei beiden Patienten konnten die Mutationen allerdings durch Sequenzanalyse der DNA aus der initial entnommenen Kolon-Biopsie bestätigt werden.

7.2 Suche nach Mutationen in weiteren Exons des *MYH*-Gens

7.2.1 Untersuchung aller Patienten mit nachgewiesener Hotspot-Mutation

Bei allen Patienten mit einer nachgewiesenen Y165C- oder G382D-Mutation (siehe Tab. 18) wurden die Exons 2-14 sowie die angrenzenden Intronabschnitte (siehe 6.2.2) durch Sequenzanalyse auf das Vorliegen neuer oder vorbeschriebener Mutationen untersucht. Hierbei wurde vor allem bei den Patienten mit Adenomen oder Karzinomen und lediglich monoallelischer Hotspotmutation eine zweite Mutation vermutet. Auf eine Analyse der Exons 1, 15 und 16 wurde aufgrund des seltenen Auftretens pathogener Mutationen in diesen Regionen bewusst verzichtet

7.2.1.1 Nachweis weiterer Genvarianten

Von den sieben untersuchten Patienten wurde bei zwei Patienten (H091 und H401) aus der CED-Gruppe und einem Patienten aus der Adenom-Gruppe (H022) eine jeweils als Polymorphismus vorbeschriebene Genvariante identifiziert. Die Patientin H401 wies die Intronveränderung IVS 6+35 G>A in heterozygoter Form auf. Hierbei wird 35 Basenpaare oberhalb des Endes von Exon 6 im Intron 6 ein Guanin durch ein Adenin ersetzt. Die ebenfalls als Polymorphismus vorbeschriebene Variante Q324H, bei der durch Austausch von Guanin gegen Cytosin an Position 17 in Exon 12 Glutamin durch Histidin im Protein ersetzt wird, wurde bei den Patienten H091 sowie H022 in heterozygotem Zustand gefunden.

7.2.1.2 Untersuchung einer Tumorprobe des Patienten H003

In der aus dem Karzinom des Patienten H003 gewonnenen DNA wurden ebenfalls die Exons 2 bis 14 sequenziert und mit den Sequenzen verglichen, die mit der aus gesunder Schleimhaut isolierten DNA erzeugt wurden. Hierbei fanden sich keine somatischen *MYH*-Mutationen, die Ursache der Karzinomentstehung sein könnten.

7.2.2 Untersuchung von Patienten mit multiplen Adenomen

Um ausschließen zu können, dass andere Varianten als die erwähnten Hotspot-Mutationen eine Rolle in dem untersuchten Kollektiv spielen, wurde bei einer Gruppe von Patienten mit multiplen Adenomen (80% der Patienten mit über 9 Adenomen und einem Alter unter 70 Jahren sowie alle Patienten mit über 25 Adenomen; H001; H008; H052; H053; H138; H190; H292; H177; H345) die Exons 2 bis 14 sequenziert (Tab. 19). Drei der Patienten hatten zusätzlich zu den Adenomen bereits mindestens ein kolorektales Karzinom entwickelt, welches bereits operiert worden war.

Tabelle 19: Charakteristika der Gruppe von Patienten mit multiplen Adenomen

Alter (Jahre)	Altersrange (Jahre)	Adenome im Durchschnitt	Adenome (Range)
51,7±17,5	18-77	20,4±17,5	9-40

7.2.2.1 Nachweis weiterer Genvarianten

In der Gruppe der Patienten mit multiplen Adenomen (siehe Tab. 19) konnten insgesamt 5 Genvarianten detektiert werden. Drei Patienten (H177; H190; H345) waren heterozygot für die Q324H-Variante (Abb. 21). Die Patientin H177 war heterozygot für die vorbeschriebene IVS 2+30 A>G-Variante (Abb. 21), bei der an Position 30 des Introns 2 Adenin durch Guanin ersetzt wird. Die ebenfalls vorbeschriebene Intronvariante IVS 6+35 G>A (siehe Abb. 22) wurde bei den Patienten H001 und H177 als heterozygote Variante gefunden. Bei keinem der Patienten konnte eine sicher pathogene Mutation detektiert werden.

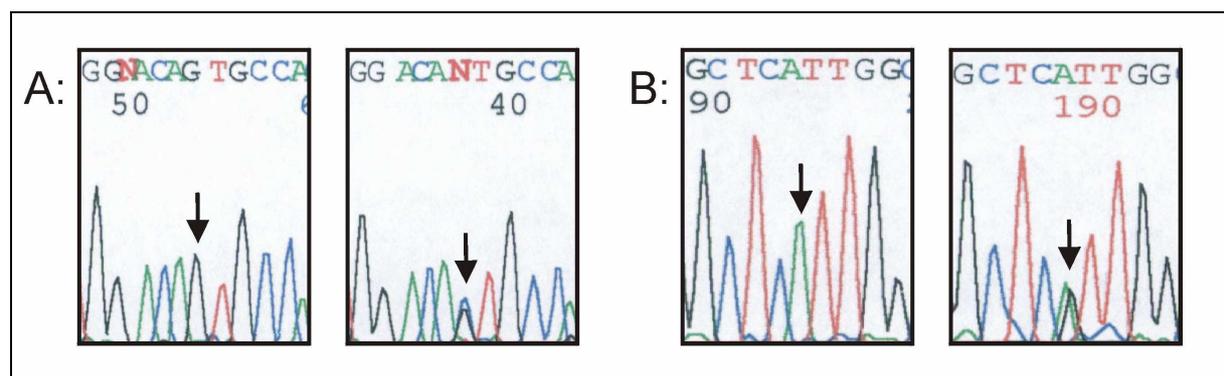


Abbildung 21: Sequenzen bekannter Varianten unklarer Pathogenität

A: Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Exon 12. Wildtyp links, heterozygote Q324H-Variante (972 G>C) rechts (↓)
 B: Dargestellt ist ein Ausschnitt aus Intron 2. Wildtyp links, heterozygote IVS 2+30 A>G-Variante rechts (↓)

7.2.3 Häufigkeit von Q324H und IVS 2+30 A>G bei Adenompatienten

Fasst man die Ergebnisse der Kapitel 7.2.1 und 7.2.2 zusammen, so wurde bei insgesamt 12 Patienten mit Adenomen (60,0±16,9 Jahre; Range 18-81 Jahre; 26±26,2 Adenome im Durchschnitt, Adenomrange 4-100 Adenome) die Exons 2-14 mitsamt großer Teile der dazwischenliegenden Introns untersucht. Die Q324H-Variante wurde bei vier der Patienten und somit 16,6% der Allele gefunden. Die IVS 2+30 A>G-Variante wurde lediglich bei einem Adenompatienten und damit 4,2% der Allele gefunden.

7.3 Häufigkeit der IVS 6+35 G>A-Variante

Die Häufigkeit der Variante (Abb. 22) wurde in einer Gruppe von 20 Adenompatienten durch Sequenzanalyse des Intron 6 bestimmt. Zusätzlich wurde die Häufigkeit der Variante bei 20 Patienten mit koloskopischem Normalbefund bestimmt und mit derjenigen bei Adenompatienten verglichen.

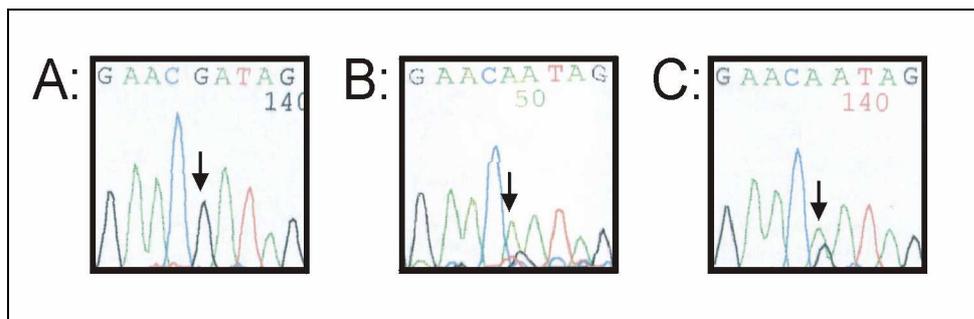


Abbildung 22: Die IVS 6+35 G>A-Variante

Darstellung der Wildtyp-Sequenz (A) sowie der homozygoten (B) und heterozygoten Variante (C). Die relevante Base ist durch einen Pfeil markiert.

In der Gruppe der Adenompatienten waren 14 Männer und sechs Frauen. Das Durchschnittsalter lag bei 62,6±13,3 Jahren (Range 18-80 Jahre). Die Patienten zeigten durchschnittlich 10,6±10,2 Adenome (Range 1-40 Adenome). In der Gruppe der Patienten mit Normalbefund wurden je zehn Männer und Frauen untersucht. Das Durchschnittsalter betrug 56,3±17,1 Jahre (Range 22-83 Jahre).

In der Adenomgruppe zeigten drei Patienten die Variante in heterozygoter Form, ein Patient war homozygot. Dieser hatte lediglich zwei Adenome, während die heterozygoten Patienten 7, 19 und 20 Adenome aufwiesen. Die Allelfrequenz betrug 12,5%. In der Gruppe der Patienten ohne Adenome wiesen drei Probanden die IVS6+35 G>A-Variante in heterozygoter Form auf. Ein Patient war homozygot für die Variante. Die Allelfrequenz betrug somit ebenfalls 12,5%.

7.4 Patienten mit nachgewiesener MYH-Genvariante

Insgesamt konnten bei zehn von uns untersuchten Patienten MYH-Genvarianten nachgewiesen werden. Der jeweilige Mutationsstatus und das Vorkommen von Adenomen oder Karzinomen bei den Mutationsträgern selbst und deren Angehörigen sind in Tab. 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Mutationsstatus und Klinik der Patienten mit nachgewiesener MYH-Genvariante

Patient	MYH-Variante (heterozygot)	kolorektale Adenome	ED-Alter	Kolorektales Karzinom	Kolorektales Karzinom bei Familienangehörigen
H003	G382D	4	79 J	79 J (pT1, Nx, Mx)	nein
H022	Y165C/Q324H	19	67 J	nein	nein
H091	G382D/Q324H	keine	-	nein	nein
H177	Q324H IVS 6+35 G>A IVS 2+30 A>G IVS 1β +3430 C>G IVS 1β+5 G>C	19	61 J	nein	Vater
H190	Q324H	17	68 J	nein	unbekannt
H308	Y165C	keine	-	nein	Vater
H345	Q324H	9	56 J	nein	nein
H401	Y165C IVS 6+35 G>A	keine	-	nein	nein
H446	Y165C	keine	-	nein	unbekannt
H503	Y165C/G382D	>100	44 J	44 J (pT1, N0, M0)	Großvater

ED=Erstdiagnose

Im Folgenden werden die Krankengeschichten der identifizierten Mutationsträger kurz zusammengefasst:

Patient H003:

Der im Jahr mit 79 Jahren verstorbene Patient H003 wies eine heterozygote G382D Mutation auf. Im Alter von 79 Jahren wurden vier Adenome und ein Kolonkarzinom (pT1, Nx, Mx) diagnostiziert. Zusätzlich litt der Patient an einem Blasen- und einem Prostatakarzinom. Der Vater verstarb an einem Bronchialkarzinom, eine Schwester verstarb an einem Pankreaskarzinom. Ein Bruder wurde bei Nierenzellkarzinom nephrektomiert. Bei dem bereits verstorbenen Sohn waren keine Kolonadenome bekannt.

Patient H022:

Der 74 Jahre alte Patient H022 zeigte eine heterozygote Y165C-Mutation und die heterozygote Q324H-Variante. Im Alter von 67 Jahren wurden zwölf kolorektale Adenome, im Alter von 70 Jahren sieben weitere Adenome entfernt. Eine bevorzugte Lokalisation der Polypen war nicht auszumachen. Die Mehrzahl der Adenome waren schmalbasige und tubuläre Adenome, die durch schnelles Wachstum auffielen.

Weder Eltern, Großeltern noch Geschwister waren oder sind von einer Krebserkrankung betroffen.

Patientin H091:

Bei der 56 Jahre alten Patientin wurde eine heterozygote G382D-Mutation in Kombination mit einer heterozygoten IVS 6+35 G>A-Variante identifiziert.

Im Alter von 46 Jahren wurde die Erstdiagnose eines Morbus Crohn gestellt, woraufhin bereits dreimal befallene Darmabschnitte reseziert wurden. Gegenwärtig besteht eine gering- bis mäßiggradige entzündliche Aktivität des Morbus Crohn.

In der Familie wurden bisher weder neoplastische noch entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes festgestellt.

Patientin H177:

Die 64 Jahre alte Patientin H177 wies eine Kombination von fünf unterschiedlichen, jeweils heterozygot vorliegenden, Genvarianten unklarer Pathogenität (IVS 1 β +5 G>C; IVS 1 β +3430 C>G; IVS 2+30 A>G; IVS 6+35 G>A; Q324H) auf. Eine Hotspotmutation wurde nicht nachgewiesen. Bei ihr wurden im Alter von 61 Jahren 19 Adenome entfernt. Dabei handelte es sich vorrangig um tubuläre Adenome mit flachem Wachstumsmuster, wobei einer davon bereits schwere Epitheldysplasien zeigte. Sechs der Adenome waren im Kolon ascendens lokalisiert. Eine vor 10 Jahren durchgeführte Ösophagogastroduodenoskopie zeigte keinen auffälligen Befund, weitere Koloskopien sind bisher nicht erfolgt.

Außer einem kolorektalen Karzinom bei dem Vater der Patientin sind keine weiteren bösartigen Erkrankungen in der Familie bekannt.

Patient H190:

Der 70 Jahre alte Patient, bei dem eine heterozygote Q324H-Variante identifiziert wurde, wies bei einer koloskopischen Untersuchung im Alter von 68 Jahren 17 Adenome auf. Eine Hotspotmutation war nicht nachweisbar.

Patientin H308:

Bei der 58 Jahre alten Patientin wurde eine heterozygote Y165C-Mutation nachgewiesen. Die Patientin ist seit dem 55. Lebensjahr dialysepflichtig. Bei einer Koloskopie mit 54 Jahren wurden zwei hyperplastische Polypen entfernt. Der Vater verstarb mit 80 Jahren am KRK.

Patient H345:

Der Patient wies lediglich den Q324H-Polymorphismus in heterozygoter Form auf. Eine der beiden Hotspotmutationen wurde nicht nachgewiesen. Mit 56 Jahren wurden neun Adenome des Kolorektums entfernt. Diese waren gleichmäßig auf alle Abschnitte des Dickdarms verteilt. Der Patient verstarb im Jahr 2006 an den Folgen eines Cholangiozellulären Karzinoms. Der Vater des Patienten verstarb an einem Ösophaguskarzinom.

Die Patientin H401:

Bei der 61 Jahre alten Patientin wurde eine heterozygote Y165C-Mutation identifiziert. Im Alter von 23 Jahren wurde eine Hemikolektomie links bei Morbus Crohn durchgeführt. Mit 40 Jahren musste eine Anastomosenstenose entfernt werden. In der Folge wurde bei ebenfalls narbigen Stenosen eine Gastroenterostomie angelegt. Klinisch sind seit der Operation keine weiteren Schübe wahrgenommen worden. Auch in den aktuellen Stufenbiopsien zeigte sich keine entzündliche Aktivität.

Patientin H446:

Bei der 80 Jahre alten Patientin wurde eine heterozygote Y165C-Mutation gefunden. Die Patientin ist dialysepflichtig. Bei ihr wurden im Alter von 78 Jahren drei hyperplastische Polypen gefunden.

Patient H503:

Der 57 Jahre alte Patient ist compound heterozygot für die beiden in der kaukasischen Rasse häufigsten *MYH*-Mutationen Y165C und G382D (Abb. 23).

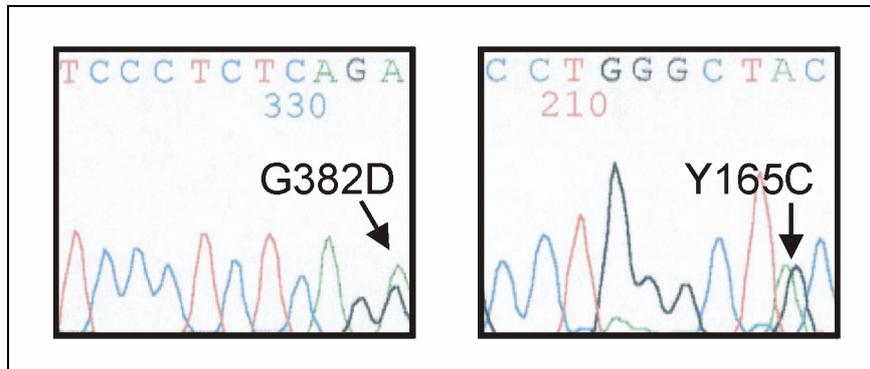


Abbildung 23: Compound heterozygoter Mutationsstatus (Y165C/G382D) bei Patient H503

Im Alter von 44 Jahren wurde bei dem Patienten eine Sigmaresektion mit Descendorektostomie und Anlage eines protektiven Anus Praeters bei perforierter Sigmadivertikulitis durchgeführt. Im Rahmen der histologischen Aufarbeitung des Resektats wurde zufällig ein Karzinom (pT1 N0 M0) auf dem Boden eines tubulovillösen Adenoms diagnostiziert. Während noch bei einer Nachsorgekoloskopie im Alter von 49 Jahren keine weiteren Adenome identifiziert werden konnten, wurden bei 11 weiteren Koloskopien zwischen dem 50. und 57. Lebensjahr (November 2000 bis März 2008) insgesamt 107 Adenome in den verbliebenen Kolon- und Rektumabschnitten endoskopisch entfernt (siehe 7.1.2.2). Somit besteht im Verlauf der Erkrankung ein FAP-Phänotyp mit über 100 Adenomen. Im Alter von 55 Jahren wurden bei dem Patienten im Bereich der Gesichtshaut präkanzeröse Dyskeratosen, seborrhoische Keratosen sowie eine aktinische Lentigo entfernt. Der Großvater des Patienten ist im Alter von über 70 Jahren am KRK verstorben. Der Vater des Patienten litt an einem Prostatakarzinom, die Mutter hatte keine maligne Erkrankung. Bei einem compound heterozygoten Mutationsstatus des Indexpatienten ist davon auszugehen, dass beide Elternteile heterozygote Träger einer der beiden Hotspotmutationen waren. Beide Elternteile sind jedoch bereits verstorben. Der Patient hat fünf Brüder und drei Schwestern. Bei keinem der Geschwister ist bislang eine Darmerkrankung bekannt. Aufgrund des Vorliegens eines autosomal rezessiven Erbgangs mit einem Risiko von 25% für die Entstehung homozygoter Nachkommen bei zwei vermutlich heterozygoten Eltern wurde den Geschwistern des Patienten eine genetische Beratung mit folgender *MYH*-Diagnostik empfohlen. Diese wurde allerdings bisher nicht wahrgenommen. Die fünf Kinder des Patienten (14-28 Jahre alt) dürften nach Ausschluss einer Y165C oder G382D-Mutation bei der Mutter maximal eine der beiden Mutationen tragen.

7.5 *MYH*-Transkriptanalyse bei verschiedenen Intronvarianten

Durch reverse Transkription von *MYH*-mRNA und anschließende Sequenzanalyse der gebildeten cDNA (6.2.3) wurde das Spleißen der primären *MYH*-Transkripte untersucht. Durch diese Spleißanalyse sollte geklärt werden, ob einzelne *MYH*-Intronvarianten unklarer Pathogenität durch Beeinträchtigung des korrekten Spleißens und somit Förderung von Fehlspleißern möglicherweise Krankheitswert besitzen. Zusätzlich wurde die Häufigkeitsverteilung der bekannten alternativen Spleißformen (siehe auch 3.3.1) untersucht, und geklärt, ob bei gesunden Personen neben diesen vorbeschriebenen Formen bisher unbekannte Spleißvarianten existieren. Zur Klärung dieser Fragen wurden die α - und β -Transkripte, die sich in ihrem ersten Exon unterscheiden (siehe auch 3.3.1), eines Patienten mit multiplen Adenomen (H177) und mehreren *MYH*-Intronvarianten mit den Transkripten von zwei darmgesunden Probanden (V1, 34 Jahre; V2, 38 Jahre) verglichen. Die γ -Transkripte wurden nicht untersucht. Es wurde der Bereich von Exon 1 α beziehungsweise 1 β bis maximal Exon 8 abgebildet (Abb. 24).

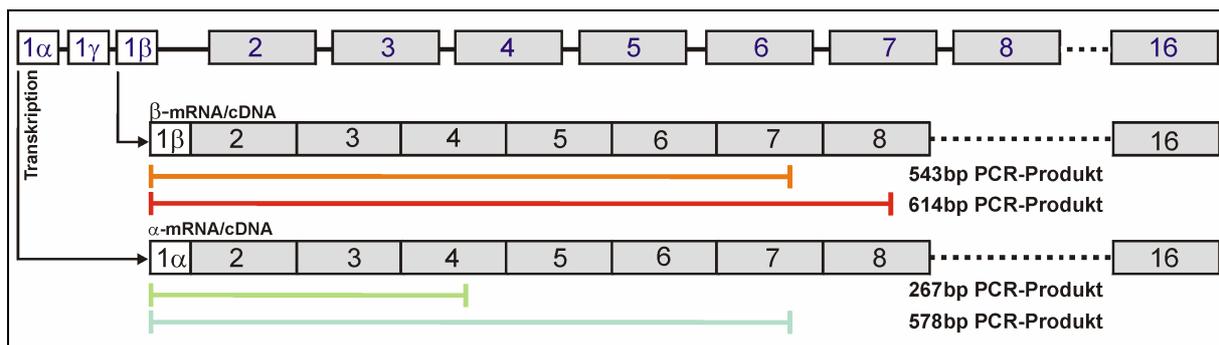


Abbildung 24: Schematische Darstellung der vier bei der Spleißanalyse untersuchten cDNA-Fragmente

In der ersten Reihe ist das *MYH*-Gen mit den einzelnen Exons dargestellt (hellgrau). Bei der Transkription des Gens wird jeweils nur eines der drei alternativen ersten Exons (α , β , γ) genutzt. In der zweiten Reihe ist die vom Exon 1 β transkribierte β -mRNA, beziehungsweise die entsprechende cDNA, dargestellt. In der dritten Reihe ist die α -mRNA/cDNA abgebildet. Die in der zweiten und dritten Reihe unter den Exons dargestellten farbigen Balken entsprechen den unterschiedlich langen RT-PCR-Produkten, die durch Verwendung von vier verschiedenen Primerpaaren erzeugt wurden und daher unterschiedlich große Teile der mRNAs abbilden. Nach Einklonieren dieser Produkte in Plasmide und Vermehrung in Bakterien konnten alternative Spleißmuster in den abgebildeten Bereichen durch Sequenzanalyse der Plasmide jeweils mehrerer Bakterienkolonien nachgewiesen werden.

7.5.1 Bestimmung des Mutationsstatus der Probanden

Vor der Spleißanalyse wurden bei der Patientin H177 und den beiden Probanden V1 und V2 die Exons 2-9 des *MYH*-Gens samt großer Teile der dazwischenliegenden Introns (6.2.2.1) durch Sequenzieren auf Genvarianten hin untersucht, die ein Fehlspleißen in dem abgebildeten Bereich bedingen könnten. Zusätzlich wurden die Exons 1 α und 1 β und der Anfang von Intron 1 bei allen drei Personen untersucht. Bei der Patientin H177 und der Vergleichsperson V1 wurde darüber hinaus das gesamte fast 6 kb lange Intron 1 sequenziert (6.2.4).

Neben den bekannten Intronvarianten IVS 2+30 A>G und IVS 6+35 G>A wurde auch die seltene IVS 1 β +5 G>C-Variante, bei der an Position 5 der 5'-Spleißstelle des Exons 1 β ein Guanin durch ein Cytosin ersetzt wird, gefunden. Im Intron 1 wurden zusätzlich die nicht vorbeschriebenen Varianten IVS 1 α +314 G>C, IVS 1 β +2900 T>G und IVS 1 β +3430 C>G identifiziert. Alle Varianten lagen heterozygot vor (Abb. 25). Die Patientin H177 und der Proband V1 wiesen jeweils 4, zum Teil verschiedene, Intronvarianten auf. Bei dem Probanden V2 wurde keine Intronvariante nachgewiesen (Tab. 21).

Tabelle 21: Intronvarianten der bei der Transkriptanalyse untersuchten Probanden

Die Varianten lagen jeweils heterozygot vor. Bei dem Probanden V2 wurde nicht das gesamte Intron 1 untersucht, sodass keine Aussage zum Vorliegen der IVS 1 β +2900 T>G und IVS 1 β +3430 C>G-Varianten bei V2 getroffen werden kann.

Proband	Alter	IVS 1 β +5 G>A	IVS 1 α +314 G>C	IVS 2+30 A>G	IVS 6+35 G>A	IVS 1 β +2900 T>G	IVS 1 β +3430 C>G
H177	61J	+	-	+	+	-	+
V1	33J	-	+	-	+	+	+
V2	37J	-	-	-	-	N	N

(+)= heterozygote Variante vorhanden; (-)= Variante nicht nachgewiesen; (N)= Bereich nicht untersucht

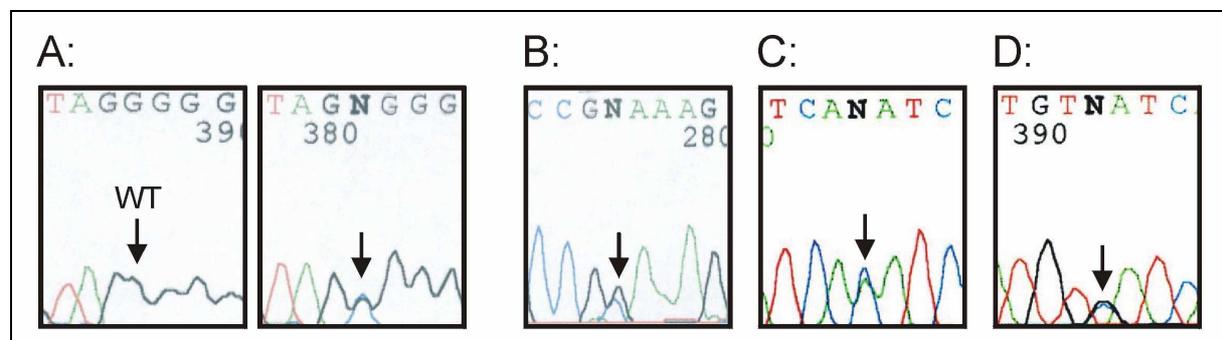


Abbildung 25: Polymorphismen im Intron 1 von *MYH*

Unter (A) ist rechts die heterozygote IVS 1 β +5 G>C-Variante, links die entsprechende Wildtyp-Sequenz dargestellt. (B) zeigt die heterozygote IVS 1 α +314 G>C-Variante. In (C) sieht man den heterozygoten Austausch 4198 T>G (IVS 1 β +2900 T>G) in Antisense-Richtung sequenziert. In (D) ist der heterozygote C>G Basenaustausch an Position 4728 (IVS 1 β +3430 C>G) dargestellt.

(↓)= Markierung der relevanten Base; WT= Wildtyp

7.5.2 Untersuchung der α -Transkripte

α -Transkripte sind durch Einbau des am weitesten 5'-gelegenen alternativen Exons 1 des *MYH*-Gens in die mRNA gekennzeichnet (siehe Abb. 24 und 28).

Es wurden die Transkripte der Patientin H177 mit denjenigen des Probanden V1 verglichen. Dabei wurden zuerst 267 bp-Produkte hergestellt, die nur die Exons 1 α bis 3 erfassen. Längere, von Exon 1 α bis 7 reichende 578 bp-Produkte wurden hergestellt um auch mögliche Effekte des Intron 6-Polymorphismus oder komplexere Rearrangements wahrzunehmen (Abb. 24 und 26).

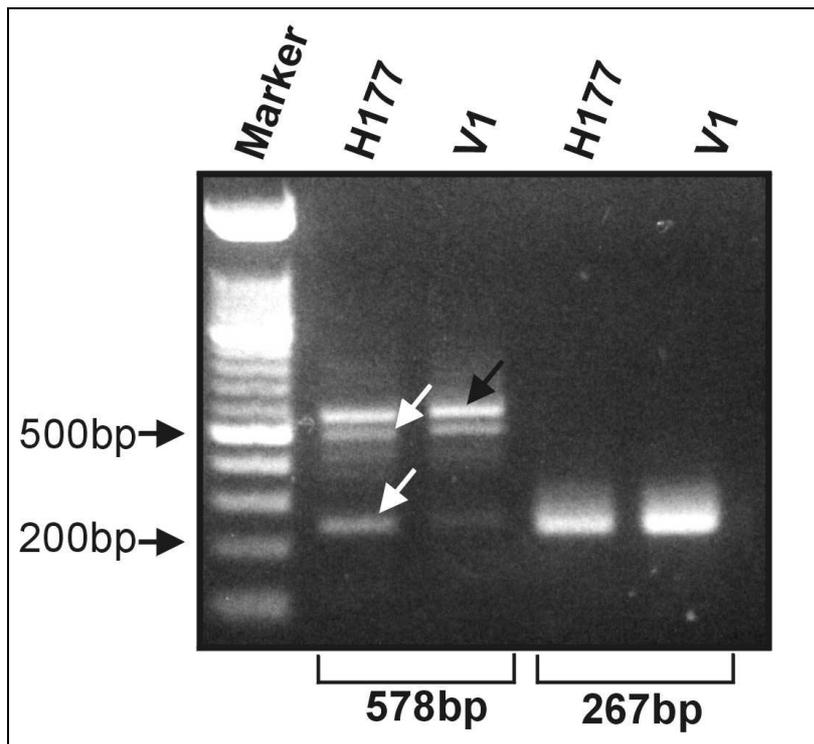


Abbildung 26: Agarosegel der α -cDNA-Amplifikate zur Spleißanalyse

Die bei normalem Spleißen entstehenden 276 bp (Exon 1 α -4) und 578 bp (Exon 1 α -7) langen RT-PCR-Produkte der Patientin H177 wurden im Agarosegel aufgetrennt und den entsprechenden Produkten des Probanden V1 gegenübergestellt. Bei den 578 bp-Produkten sind sowohl bei H177 als auch bei V1 mehrere kürzere Banden schwächerer Intensität (teilweise durch weiße Pfeile markiert) neben der erwarteten Bande (schwarzer Pfeil) zu erkennen. Diese entsprechen deutlich kürzeren alternativen Spleißformen. Die beiden rechten Banden entsprechen den 267 bp-Produkten.

7.5.2.1 267 bp- α -Produkte

Es ist bekannt, dass das Exon 3 des *MYH*-Gens alternativ gespleißt wird. Durch reverse Transkription der alternativ gespleißten und daher unterschiedlich langen *MYH*-mRNAs und nachfolgende Amplifikation der ebenfalls unterschiedlich langen cDNAs entsteht ein Gemisch unterschiedlich langer Produkte. Ein direktes Sequenzieren ist daher nicht möglich. Deshalb wurden die Produkte in Plasmide integriert und nach Transformation von Bakterien durch Bakterienkultur einzeln vermehrt (6.2.3.2.). Alle Plasmide von Bakterien einer Kolonie enthalten daher Kopien einer einzigen cDNA. Nach Isolation der Plasmide konnten die inklonierten Sequenzen analysiert werden.

Im Fall der Patientin H177 konnten 19 von 20 erzeugten Sequenzen, die jeweils eine mRNA abbilden sollten, ausgewertet werden. Eine Sequenz war nicht lesbar. Bei dem Probanden V1 konnten 18 der 20 Sequenzen ausgewertet werden.

7.5.2.1.1 Häufigkeitsverteilung der alternativ gespleißten Exon 3-Formen

Der Anfang des *MYH*-Exons 3 wird durch Nutzung multipler 3'-Spleißstellen alternativ gespleißt (Abb. 27). Hieraus ergibt sich die Existenz mehrerer, alternativer *MYH*-mRNAs, die entsprechend der zeitlichen Abfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert wurden und im Falle der α -Transkripte (Nutzung von Exon 1 α) als α 1- α 4-mRNAs bezeichnet werden.

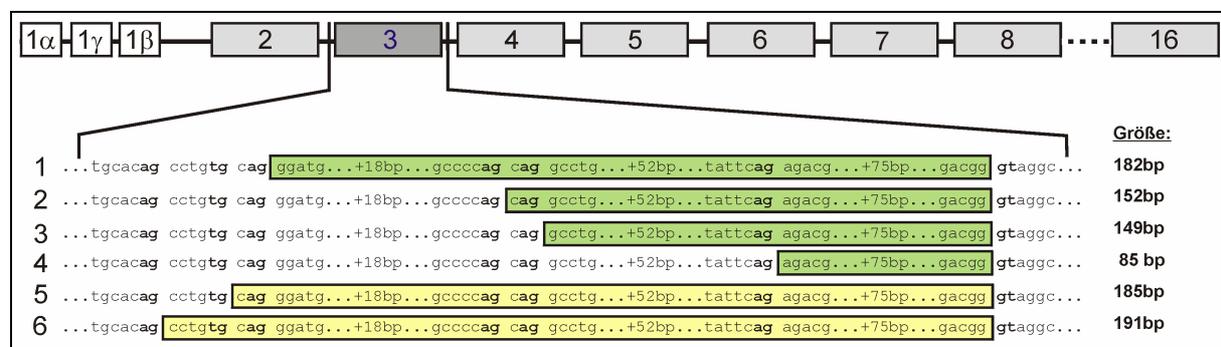


Abbildung 27: Die alternativen Exon 3-Spleißformen

In der oberen Reihe sind die Exons des *MYH*-Gens schematisch dargestellt. Je nach genutztem Exon 1 werden die bei Transkription entstehenden mRNAs als α - β - oder γ -Formen bezeichnet. Das Exon 3 wird alternativ gespleißt. Die farbigen Kästen unterhalb entsprechen den durch alternatives Spleißen entstehenden Exon 3-Varianten, die entsprechend dem Zeitpunkt ihrer Beschreibung durchnummeriert werden (Zahlen vor den Sequenzen). Die Länge der jeweiligen Exon 3-Form ist ganz rechts angegeben. Mögliche nutzbare 3'-Spleißstellen für Exon 3 sind fett gedruckt. Die Varianten 1-4 (grün) sind vorbeschrieben, die Varianten 5 und 6 (gelb) wurden neu identifiziert. Während Variante 6 bei den 267 bp- α -Transkripten nachgewiesen wurde, wurde die Variante 5 nur bei den 543 bp- β -Transkripten nachgewiesen.

Durch die Lage des Reverse-Primers in Exon 3 konnten die α 4-Formen in unseren Versuchen bei den 267 bp-Produkten nicht miterfasst werden. Bei den in Kapitel 7.5.2.2 untersuchten 578 bp-Produkten werden dagegen auch die α 4-Formen erfasst.

Unabhängig davon, ob in anderen Bereichen der Transkripte Auffälligkeiten oder Spleißfehler beobachtet wurden, wurde jede der mRNAs einer dieser alternativen Exon 3-Spleißformen zugeordnet (Abb. 28).

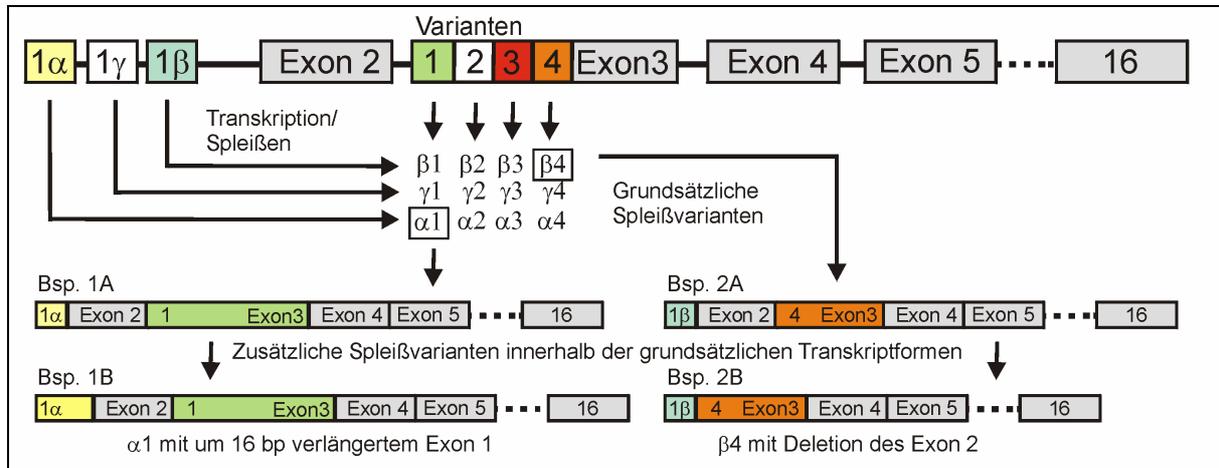


Abbildung 28: Nomenklatur der MYH-Transkripte

In der oberen Reihe ist das *MYH*-Gen abgebildet. Die vorbeschriebenen Spleißvarianten (1-4) des Exons 3 sind schematisch dargestellt und durch unterschiedliche Hintergrundfarben gekennzeichnet, auf Darstellung der neu nachgewiesenen Varianten 5 und 6 wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Die genaue Bezeichnung einer mRNA ergibt sich aus der Bezeichnung des genutzten ersten Exons (α - β - oder γ -), und der genutzten Spleißvariante (1-4) des Exons 3. Zwei Beispiele ($\alpha 1$; $\beta 4$; Beispiele 1A und 2A) für diese in der Folge als grundsätzliche Spleißvarianten bezeichneten Transkripte sind in der mittleren Reihe dargestellt. Zusätzlich zu diesen grundsätzlichen Spleißvarianten durch Nutzung unterschiedlicher erster Exons und alternativem Spleißen des Exons 3 können weitere Exons oder Teile davon beim Spleißen verloren gehen oder ganze Introns beziehungsweise Teile davon eingespleißt werden (Beispiele 1B und 2B in der untersten Reihe).

Sowohl bei der Patientin H177 als auch bei Proband V1 war die $\alpha 3$ -mRNA mit 14/19 beziehungsweise 15/18 Fällen die häufigste Form (Tab. 22). Eines der Transkripte der Patientin H177 konnte nicht den bekannten Formen zugeordnet werden, sondern wies ein im Vergleich zu $\alpha 1$ am 5'-Ende um 9 Basenpaare verlängertes Exon 3 auf (Abb. 27 und 30). Diese Variante wurde von uns als $\alpha 6$ -Form bezeichnet.

Tabelle 22: Häufigkeit der alternativen Exon 3-Formen bei den 267 bp- α -Produkten (H177 und V1)

Es konnten 19 beziehungsweise 18 klonierte Sequenzen ausgewertet werden. Die $\alpha 6$ -Form wurde von uns erstmals beschrieben. Die $\alpha 4$ -Form kann bei den 267 bp-Produkten aufgrund der Primerlage nicht erfasst werden.

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 1+9\text{bp} (\alpha 6)$
H177 (n=19)	2 (10,5%)	2 (10,5%)	14 (73,7%)	1 (5,3%)
V1 (n=18)	2 (11,1%)	1 (5,6%)	15 (83,3%)	0 (0%)

7.5.2.1.2 Neue Spleißvarianten bei der Patientin H177

Bei 16 von 19 cDNAs wurden bei der Sequenzanalyse keine Auffälligkeiten beobachtet. Zwei Transkripte zeigten ein am 3'-Ende um vier Basenpaare verkürztes Exon 1 α (Abb. 29). Dieses entsteht durch Deletion der Basenfolge GTGG am Ende des Exons 1 α bei Nutzung einer alternativen 5'-Spleißstelle. Die Variante trat sowohl in Kombination mit der α 1- als auch in Kombination mit der α 2-Form (andere Exon 3-Variante genutzt; siehe Abb. 28) auf.

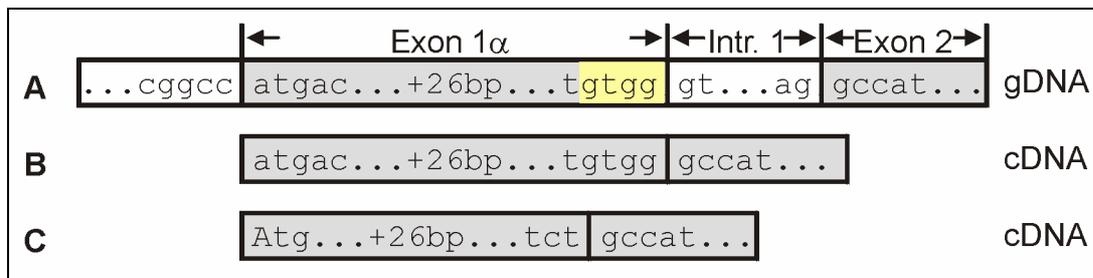


Abbildung 29: Schema zur Deletion von GTGG am Ende von Exon 1 α

Die in der Gensequenz (A) gelb hinterlegten Basen gehen im Vergleich zu normalem Spleißen (B) bei der Spleißvariante (C) verloren.

Weiterhin wurde ein Transkript mit einem am 5'-Ende um 9 Basenpaare verlängerten Exon 3 gefunden. Diese alternative, von uns als Variante 6 bezeichnete, Exon 3-Variante entsteht durch Nutzung einer alternativen AG-Spleißstelle und ist 191 bp lang (Abb. 30 und Tab. 22). Die mRNA, die dieses Exon aufwies wurde aufgrund der Nutzung von Exon 1 α als α 6 bezeichnet.

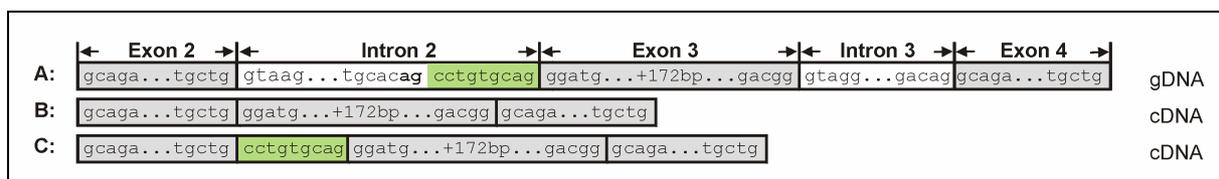


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Variante 6 des Exons 3

Unter (A) ist die genomische *MYH*-Sequenz, in (B) ein normal gespleißtes Transkript abgebildet. In dem fehlgespleißten Transkript (C) ist das im Vergleich zur Variante 1 des Exons 3 (B) um 9 bp verlängerte Exon 3 zu sehen. Die neu genutzte Spleißstelle (ag) in Intron 2 ist fett gedruckt, der eingespleißte Bereich grün hinterlegt.

7.5.2.1.3 Neue Spleißvarianten bei dem Probanden V1

Ein Transkript beinhaltete ein um 16 Basenpaare verlängertes Exon 1 α , das durch Nutzung einer alternativen GT-Spleißstelle entsteht (Abb. 31). Diese Variante trat in einem α 3 Transkript auf. Die restlichen 17 von 18 Transkripten zeigten keinerlei Auffälligkeiten.

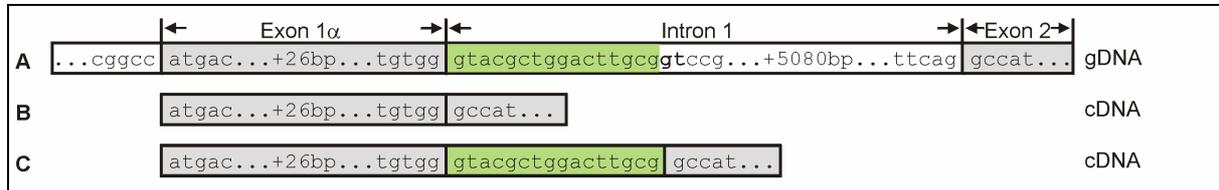


Abbildung 31: Schematische Darstellung des um 16 bp verlängerten Exons 1 α

In (A) ist die genomische Sequenz dargestellt. Die neu genutzte Spleißstelle in Intron 1 ist fett gedruckt. Unter (B) ist eine normal gespleißte cDNA zu sehen. Teil (C) zeigt das eingespleißte Fragment (grün).

7.5.2.2 578 bp- α -Produkte

Sowohl bei der Patientin H177 als auch bei dem Probanden V1 konnten 19 von 20 Sequenzen ausgewertet werden.

7.5.2.2.1 Häufigkeitsverteilung der alternativ gespleißten Exon 3-Formen

Bei beiden Personen stellte die α 4-Form das häufigste Transkript dar. Während die α 3-Form ebenfalls relativ häufig gefunden wurde, waren die α 2- und α 1-Transkripte deutlich seltener. In einigen Fällen fehlte Exon 3, sodass die Transkripte keiner dieser grundsätzlichen Spleißformen zugeordnet werden konnten (Tab. 23; siehe auch Abb. 27).

Tabelle 23: Häufigkeit der Exon 3-Varianten bei den 578 bp- α -Produkten (H177 und V1)

Pro Patient konnten 19 von 20 klonierten Sequenzen ausgewertet werden. Die α 6-Form wurde von uns erstmals beschrieben. Bei Deletion des Exons 3 ist eine Zuordnung nicht möglich.

	α 1	α 2	α 3	α 4	α 1+9bp (α 6)	kein Exon 3
H177 (n=19)	1 (5,3%)	3 (15,8%)	4 (21,0%)	5 (26,3%)	1 (5,3%)	5 (26,3%)
V1 (n=19)	2 (10,5%)	0 (0%)	7 (36,8%)	9 (47,4%)	0 (0%)	1 (5,3%)

7.5.2.2.2 Neue Spleißvarianten bei der Patientin H177

Lediglich fünf von 19 untersuchten Transkripten zeigten keinerlei Auffälligkeiten und entsprachen den vorbeschriebenen Transkripten. Jeweils zwei davon waren α 3- und α 4-Formen, eines entsprach der α 2-Form.

Die bereits bei den kürzeren Produkten gefundene Deletion von 4 Basenpaaren (GTGG) am Ende von Exon 1 α (7.5.2.1.2) konnte auch hier in vier Transkripten beobachtet werden. Dabei

trat die Variante jeweils einmal in Kombination mit der α 1- und der α 4-Form auf. Ebenfalls einmal wurde sie gemeinsam mit dem im Vergleich zu α 1 um 9 Basenpaare verlängerten Exon 3 (α 6; 7.5.2.1.2) sowie einmal bei fehlendem Exon 3 beobachtet.

Auch die bereits bei den 267 bp-Produkten beschriebene Verlängerung des Exons 1 α um 16 Basenpaare durch Transkription des Beginns von Intron 1 wurde je einmal in Kombination mit den α 2- und α 4-Formen gefunden (7.5.2.1.3).

Relativ häufig wurde das Fehlen mindestens eines Exons beobachtet. Teilweise wurden aber auch bis zu vier hintereinanderliegende Exons übersprungen (Abb. 32). So kam es in drei Fällen zum Verlust von Exon 6. Die Variante trat bei je einer α 1-, α 2- und α 3-Form auf.

Ein Überspringen von Exon 5 wurde bei einem α 4-Transkript gefunden. Ebenfalls in einem α 4-Transkript wurde ein gleichzeitiges Auslassen der Exons 5 und 6 beobachtet. In vier Transkripten kam es zu einem Überspringen der Exons 3-6, ein weiteres wies den Verlust der Exons 2-6 auf. Neben dem Auslassen von sonst genutzten Exons (*exon-skipping*) wurde auch die Überschreibung von ganzen Introns in mRNA (*intron-retention*) beobachtet. So wurde bei einem α 3-Transkript die gesamte Intron 5-Sequenz eingespleißt.

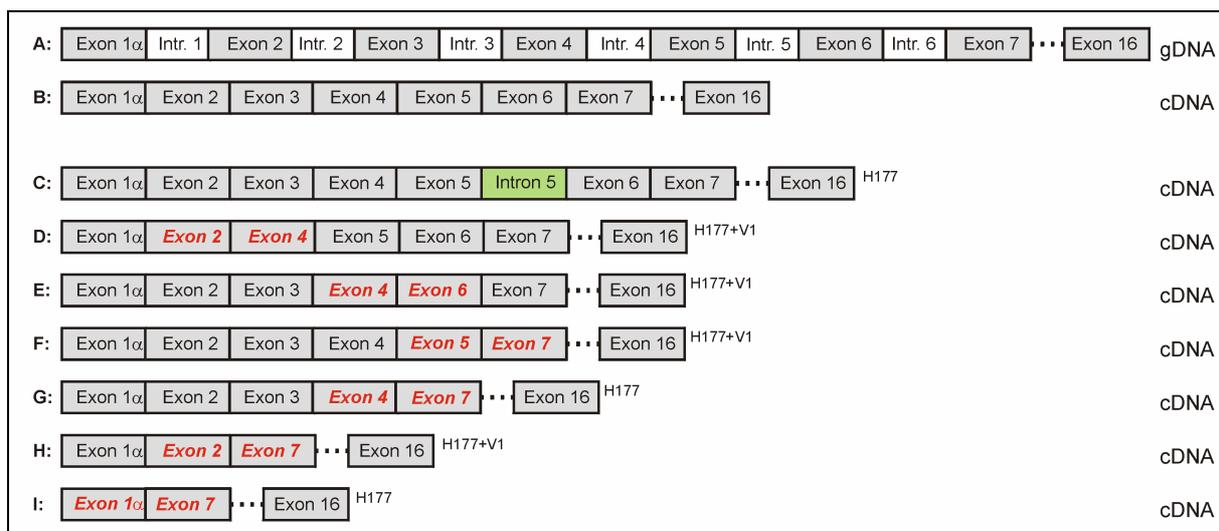


Abbildung 32: Deletion und Insertion größerer Genabschnitte im Fall der α -Produkte (H177 und V1)

(A) genomische Sequenz, (B) normales Spleißprodukt, (C) Retention des Introns 5, (D) Deletion des Exons 3, (E) Deletion des Exons 5, (F) Deletion des Exons 6, (G) Deletion der Exons 5+6, (H) Deletion der Exons 3-6, (I) Deletion der Exons 2-6

Exons zwischen denen eine Deletion stattfand, sind kursiv gedruckt und rot markiert. Rechts neben den Varianten ist angegeben, bei welcher Person die jeweilige Spleißvariante gefunden wurde.

Bei einem Teil der Transkripte wurden mehrere der beschriebenen Auffälligkeiten gleichzeitig in einem Transkript gefunden (Abb. 33). So zeigte eines der α 1-Transkripte das um 4 bp verkürzte Exon 1 (del GTGG; siehe auch Abb. 29) und ein Auslassen von Exon 5 (siehe auch Abb. 32). Bei einem weiteren Transkript mit um 4 bp verkürztem Exon 1 (del GTGG; siehe auch Abb. 29) fehlten zusätzlich die Exons 2-6 (siehe auch Abb. 32). Bei einem

α 4-Transkript wurde neben dem um 16 bp verlängerten Exon 1 (siehe Abb. 31) auch ein Verlust von Exon 5 (siehe auch Abb. 32) gefunden.

7.5.2.2.3 Neue Spleißvarianten bei dem Probanden V1

Zwölf von 19 cDNAs wiesen keinerlei Auffälligkeiten auf. Insgesamt wurden bei der Vergleichsperson seltener ungewöhnliche Transkripte gefunden als bei der Patientin H177. Dennoch zeigte ein Teil der Transkripte die gleichen Auffälligkeiten wie die Transkripte der Patientin. So konnte das um 16 Basenpaare verlängerte Exon 1 α (7.5.2.1.3) zweimal bei einer α 4- und einmal bei einer α 3-mRNA gesehen werden. Das um die vier Basen GTGG verkürzte Exon 1 α (7.5.2.1.2) trat einmal in Kombination mit der α 1-Form auf. Einmal wurde es in Kombination mit einem Verlust der Exons 3-6 gefunden. Jeweils ein α 3- und ein α 4-Transkript zeigte eine Deletion des gesamten Exons 6. Das Exon 5 wurde lediglich einmal bei einer α 3-Form ausgelassen. Gleichzeitig beinhaltete dieses Transkript das um 16 Basenpaare verlängerte Exon 1.

Ein paralleles Auftreten von zwei Varianten konnte somit bei zwei Transkripten beobachtet werden (Abb. 33).

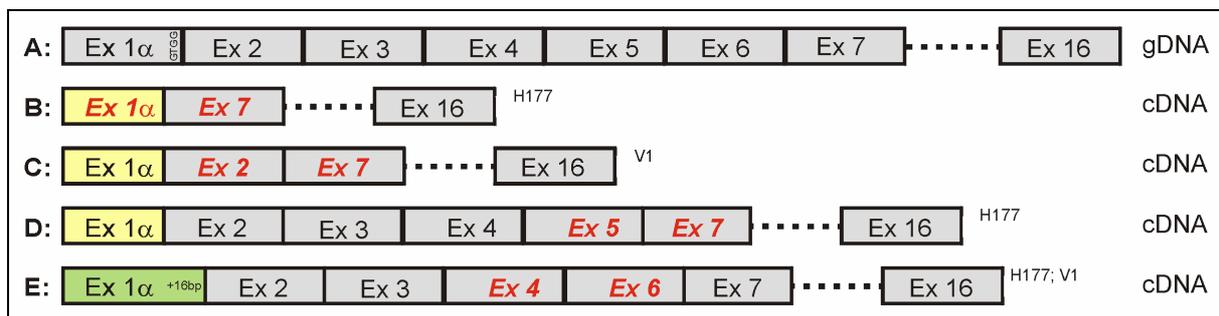


Abbildung 33: Kombinationen von Spleißvarianten bei den α -Transkripten (H177 und V1)

(A) normal gespleißtes Transkript, (B) Exon 1 del GTGG und del Exon 2-6, (C) Exon 1 del GTGG und del Exon 3-6, (D) Exon 1 del GTGG und del Exon 6, (E) Exon 1 +16 bp und del Exon 5. Gelbe Kästchen stehen für das um 4 bp verkürzte Exon 1 α (del GTGG). Grüne Kästchen für das um 16 bp verlängerte Exon 1 α . Exons, zwischen denen beim Spleißen ganze Exons verloren gegangen sind, sind kursiv und rot beschriftet. Rechts neben den Varianten ist angegeben, bei welcher Person die Variante gefunden wurde.

7.5.2.3 Zusammenfassende Betrachtung der α -Transkripte

Fasst man die Ergebnisse der Analyse der kürzeren (267 bp) und der längeren (578 bp) Produkte zusammen, so konnten bei Analyse von insgesamt 75 Transkripten 31 auffällige Transkripte gezählt werden, die sich auf neun von uns erstmals beschriebene Spleißvarianten verteilen (Tab. 24). Zum Teil wurden auch Kombinationen dieser Varianten beobachtet. Größtenteils wurden die neuen Varianten sowohl bei der Patientin H177 wie auch bei dem Probanden V1 gefunden.

Tabelle 24: Übersicht über die bisher nicht bekannten Spleißvarianten der α -Transkripte (H177 und V1)

Bei den neu beschriebenen Spleißvarianten ist in Klammer angegeben, bei welcher grundsätzlichen Transkriptform (α 1-6, je nach Länge des Exon 3) sie gefunden wurden. Bei Verlust des Exon 3 kann das Transkript keiner dieser Formen zugewiesen werden. Das Transkript mit um 9 bp verlängertem Exon 3 kann als α 1-Transkript mit verlängertem Exon 3, oder aber, wie von uns vorgeschlagen, als α 6-Form bezeichnet werden. Da auch Kombinationen von Spleißvarianten auftraten, entspricht die Summe der Häufigkeit der einzelnen Spleißvarianten nicht der Anzahl der auffälligen Transkripte.

	H177	V1
Untersuchte Transkripte	38	37
Normale Transkripte	21	29
Auffällige Transkripte	17	8
Häufigkeit neuer Varianten		
Um 4 bp verkürztes Exon 1 (del GTGG)	6 (2x α 1, 1x α 3, 1x α 4, 1x α 6, 1x kein Exon 3)	2 (1x α 1, 1x kein Exon 3)
Um 16 bp verlängertes Exon 1	2 (1x α 2, 1x α 4)	4 (1x α 1, 1x α 3, 2x α 4)
Um 9 bp verlängertes Exon 3	2	-
Deletion des Exon 5	1 (1x α 4)	1 (1x α 3)
Deletion des Exon 6	3 (1x α 1, 1x α 2, 1x α 3)	2 (1x α 3, 1x α 4)
Deletion der Exons 5 und 6	1 (1x α 4)	-
Deletion der Exons 2 bis 6	1	-
Deletion der Exons 3 bis 6	4	1
Retention des Introns 5	1 (1x α 3)	-

Fasst man die Ergebnisse der Analyse der längeren 578 bp-Produkte, durch die auch die α 4-Transkripte erfasst werden, der Patientin H177 und des Probanden V1 zusammen, so fällt auf, dass die grundsätzlichen Transkriptformen α 1 bis α 4 unterschiedlich häufig vorkommen. Darüber hinaus wiesen diese grundsätzlichen Transkriptformen α 1 bis α 4 auch unterschiedlich oft die oben beschriebenen Auffälligkeiten auf (Tab. 25; siehe auch Tab. 24).

Tabelle 25: Verteilung der Exon 3-Formen der α -Transkripte und Anzahl der auffälligen Formen

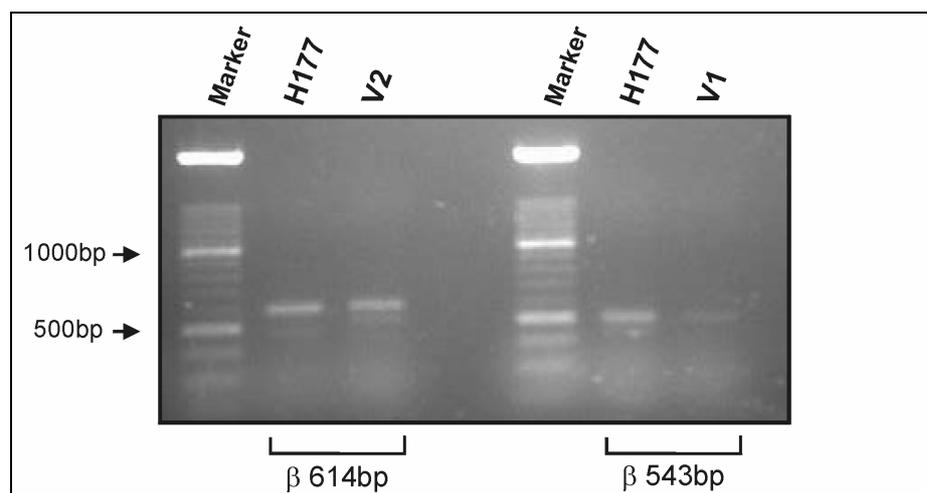
Untersucht wurden 38 einklonierte Sequenzen (578 bp-Produkte) der beiden Personen H177 und V1 (je 19), die dann den grundsätzlichen mRNA-Formen α 1-4 zugeordnet wurden. In der unteren Zeile ist aufgeführt, wie häufig diese grundsätzlichen Formen zusätzliche Spleißvarianten aufwiesen. Die von uns erstmals beschriebene α 6-Form wurde hier als auffällige α 1-Form (um 9 bp verlängertes Exon 3) gewertet.

Transkriptform	α 1	α 2	α 3	α 4	kein Ex 3
Anzahl gefundener Transkripte (n=38)	4 (10,5%)	3 (7,9%)	11 (29,0%)	14 (36,8%)	6 (15,8%)
Auffällige Transkripte pro Form:	3 (75,0%)	2 (66,6%)	4 (36,4%)	6 (42,9%)	6 (100%)

7.5.3 Untersuchung der β -Transkripte

Bei den β -Formen der MYH-mRNA wird das distalste der drei alternativen ersten Exons genutzt (siehe Abb. 24 und 28). Die mittels RT-PCR erzeugten 543 bp-Produkte (siehe Abb. 24 und 34) entsprechen den Exons 1 β bis 7 der mRNA. Die Produkte der Patientin H177 wurden hierbei mit denjenigen des Probanden V1 verglichen.

Zusätzlich wurden noch längere 614 bp- β -Produkte hergestellt (siehe Abb. 23 und 33), welche die mRNAs bis in das Exon 8 hinein abbilden. Dadurch war es möglich, auch ein eventuelles Überspringen von Exon 7 als Folge des IVS 6+35 G>A-Polymorphismus wahrzunehmen. Hierbei wurden die Produkte der Patientin H177 mit denen des Probanden V2 abgeglichen, der keine Intronvarianten aufwies.

**Abbildung 34: Agarosegel der β -cDNA-Amplifikate zur Spleißanalyse**

Die bei regulärem Spleißen 614 bp (Exons 1-8) und 543 bp (Exons 1-7) langen RT-PCR-Produkte der Patientin H177 wurden im Agarosegel aufgetrennt und den entsprechenden Produkten der Probanden V2 beziehungsweise V1 gegenübergestellt. Kürzere Zusatzbänder, die auf alternative Spleißformen hinweisen könnten, sind jeweils nur zu erahnen.

7.5.3.1 543 bp- β -Produkte

Bei der Patientin H177 konnten 19 von 20 Sequenzen, die der MYH-mRNA entsprechen, ausgewertet werden. Bei Proband V1 waren alle 20 Sequenzen lesbar.

7.5.3.1.1 Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Exon 3-Formen

Auch bei den β -Transkripten wird das Exon 3 durch Nutzung multipler 3'-Spleißstellen alternativ gespleißt. Entsprechend der Nomenklatur der α -Transkripte werden die β -Formen mit identischem Exon 3 mit der gleichen Ziffer versehen. So entspricht beispielsweise die β 3-Form, abgesehen von dem unterschiedlichen Exon 1, genau der α 3 Form. Unabhängig davon, ob in anderen Bereichen der Transkripte Auffälligkeiten oder Spleißfehler beobachtet wurden, wurde jede der β -mRNAs einer dieser grundsätzlichen Spleißformen zugeordnet (siehe Abb. 27).

Während bei der Patientin H177 die β 3-Form mit deutlichem Abstand am häufigsten beobachtet wurde, wurde bei dem Probanden V1 noch häufiger als diese Form ein Fehlen des Exons 3 gefunden (Tab. 26).

Tabelle 26: Alternative Exon 3-Formen bei den 543 bp- β -Produkten (H177 und V1)

Es konnten 19 beziehungsweise 20 klonierte Sequenzen ausgewertet werden und den verschiedenen grundsätzlichen Spleißformen zugeordnet werden. Bei Deletion des Exons 3 ist eine Zuordnung nicht möglich.

	β 1	β 2	β 3	β 4	kein Exon 3
H177 (n=19)	1 (5,3%)	2 (10,5%)	12 (63,1%)	3 (15,8%)	1 (5,3%)
V1 (n=20)	3 (15%)	2 (10%)	7 (35%)	1 (5%)	7 (35%)

7.5.3.1.2 Auffällige Transkripte der Patientin H177

Neun von 20 Transkripten wiesen keinerlei Auffälligkeiten auf. In sechs Transkripten wurde eine bereits einmal vorbeschriebene 237 bp-Insertion (Abb. 35) im Anschluss an das vollständige Exon 1 β gefunden, welche dem unmittelbar auf dieses Exon folgenden Beginn von Intron 1 entspricht. Die bei dieser Patientin an Position 5 monoallelisch mutierte 5'-Spleißstelle des Exons 1 (IVS 1+5 G>C; 7.4.1), die für das korrekte Abspießen am Ende des Exons verantwortlich ist, wurde in dem Insert mitabgebildet. Dabei wurde in fünf Transkripten mit dem Insert die vom gesunden Allel kopierte, nicht mutierte Form der Spleißstelle mit einem G an Position 5 gefunden. Nur ein Transkript zeigte das C-Allel. Diese 237 bp Insertion wurde fünfmal bei β 3-Formen und nur einmal bei einer β 1-Form gefunden.



Abbildung 35: Schematische Darstellung der Spleißvariante mit einem 237 bp-Insert aus Intron 1

Die heterozygote Genvariante IVS 1β+5 G>C ist in der genomischen Sequenz (A) dunkelgrau hinterlegt. Die neu genutzte Spleißstelle ist fett gedruckt. (B) zeigt ein normal gespleißtes Transkript. (C) und (D) zeigen Transkripte mit den eingespleißten 237 bp (grün). Sowohl das Wildtyp-G (blau) als auch das C (rot) der IVS 1+5 G>C Variante wurden in den eingespleißten Sequenzen beobachtet.

Ein weiteres β4-Transkript zeigte eine Retention der Introns 5 und 6 in die mRNA. Ein Überspringen der Exons 3-6, wie es bereits bei den α-Formen gefunden wurde, konnte nur einmal identifiziert werden. Andere bereits bei den α-Produkten beobachtete Spleißvarianten wurden nicht gefunden.

Ein grundsätzlich als β1-Form zu bezeichnendes Produkt zeigte ein besonders komplexes Muster an Auffälligkeiten (Abb. 36). Das Exon 3 wurde im Vergleich zur β1-Form um die letzten drei Basen des Introns 2 (CAG) erweitert (β5; Abbildung 38). Zusätzlich beinhaltete dieses Transkript das 237 bp-Insert im Anschluss an Exon 1 (siehe Abb. 35). Auf dieses folgte ein 141 bp langes Insert, das im Genom 4932 Basenpaare unterhalb des Endes von Exon 1β im Intron 1 liegt (Abb. 37). Der Beginn dieses Inserts liegt an Position 6230 des *MYH*-Gens (AF527839).

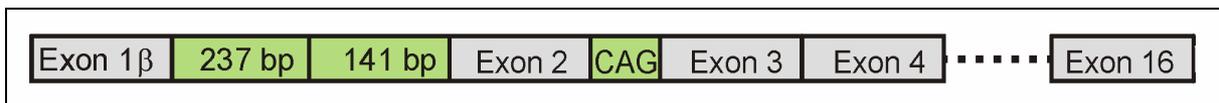


Abbildung 36: Schematische Darstellung einer komplexen Spleißvariante

Neben dem 237 bp-Insert aus Intron 1 ist ein 141 bp langes Insert aus Intron 1 eingespleißt worden. Die Variante 1 des Exon 3 ist an ihrem 5'-Ende um CAG verlängert (erstmalig beschriebene Variante 5 des Exons 3).

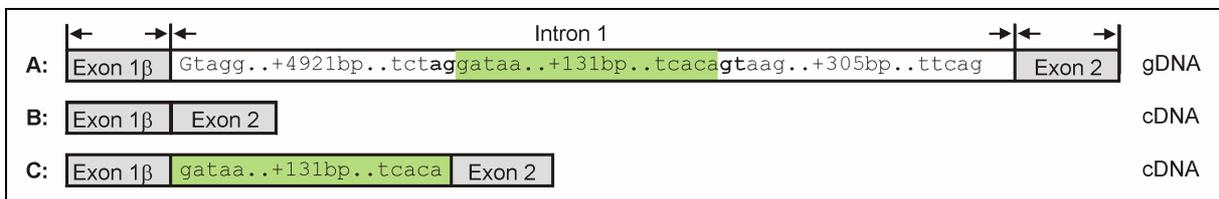


Abbildung 37: Schematische Darstellung des 141 bp-Inserts aus Intron 1

Der in der gDNA-Sequenz (A) grün hinterlegte Bereich aus Intron 1 wurde durch Nutzung der fett gedruckten Spleißstellen fälschlicherweise eingespleißt. In (B) ist die cDNA eines normalen Spleißprodukts dargestellt. (C) zeigt das um 141 bp verlängerte, fehlgespleißte Transkript.

7.5.3.1.3 Neue Spleißvarianten bei dem Probanden V 1

Insgesamt wiesen zehn von 19 Transkripten keinerlei Besonderheiten auf. Der bereits bei der Patientin H177 beobachtete, im Vergleich zu $\beta 1$, um drei Basen vorverlegte Beginn des Exons 3 (Abb. 38), der durch Überschreiben der letzten drei Basen (CAG) des Introns 2 zustande kommt, wurde in einem Transkript gefunden. Diese Variante wurde von uns als Spleißform 5 des Exons 3 bezeichnet. Aufgrund der Nutzung des Exon 1 β wurde das gesamte Transkript als $\beta 5$ -mRNA bezeichnet.

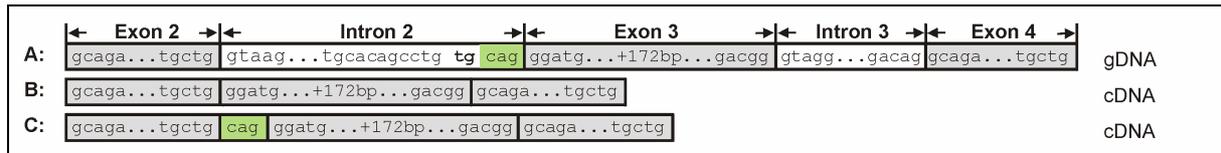


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Variante 5 des Exons 3

(A) normale genomische DNA-Sequenz. Die bei der Spleißvariante neu genutzte, ungewöhnliche (TG) Spleißstelle in Intron 2 ist fett gedruckt. Ein normal gespleißtes Transkript ist in (B) dargestellt. In (C) ist das im Vergleich zur Variante 1 des Exons 3 (B) um 3 bp verlängerte (grün) Exon 3 zu sehen, das von uns als Variante 5 des Exons 3 bezeichnet wurde.

Ein Teil der Transkripte wies Deletionen ganzer Exons oder Retentionen von Introns auf (Abb. 39). Vier Transkripte zeigten ein isoliertes Überspringen von Exon 3. Auch wurde der gemeinsame Ausfall der Exons 3 bis 6 beobachtet. Diese Variante wurde ebenfalls in drei Fällen gefunden. Zwei $\beta 4$ -Varianten zeigten eine Retention der Introns 4 und 5, bei einer weiteren $\beta 4$ -Form wurden die Introns 5 und 6 eingeschleißt.

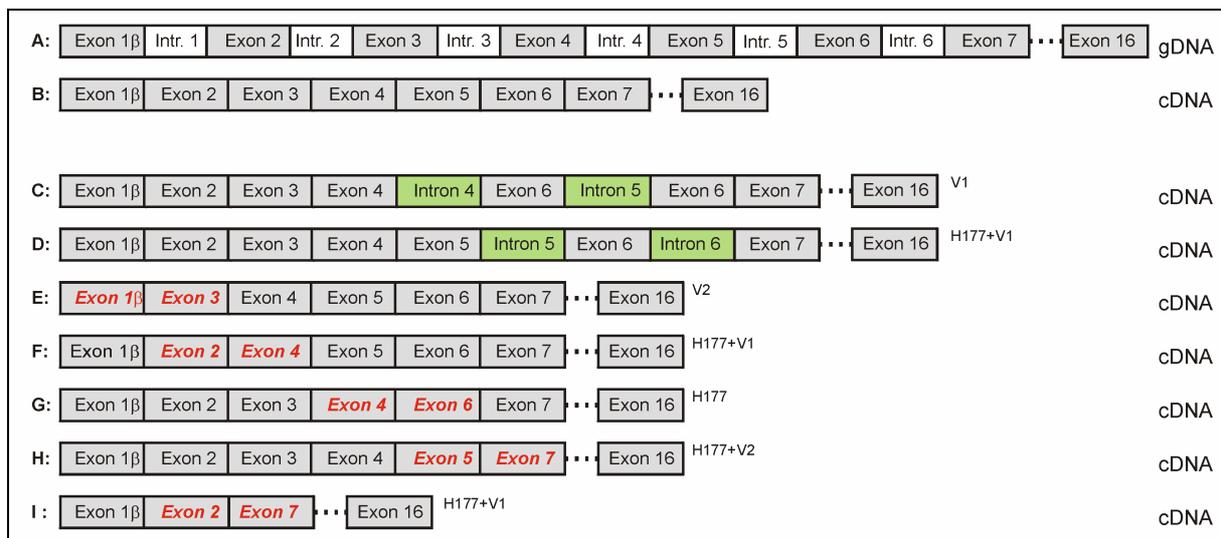


Abbildung 39: Deletion und Insertion größerer Genabschnitte im Fall der β -Produkte (H177 und V1)

(A) genomische Sequenz, (B) normales Spleißprodukt, (C) Retention der Introns 4 und 5, (D) Retention der Introns 5 und 6, (E) Deletion des Exons 2, (F) Deletion von Exon 3, (G) Deletion von Exon 5, (H) Deletion von Exon 6, (I) Deletion der Exons 3-6. Exons zwischen denen eine Deletion stattfand, sind rot und kursiv gedruckt. Neu eingeschleißte Introns sind grün dargestellt.

Bei zwei der Spleißformen mit fehlendem Exon 3 wurde stattdessen eine 150 bp lange, exonartige, dem Intron 1 entstammende Sequenz eingespleißt (Abb. 40). Diese beginnt im *MYH*-Gen 1006 bp oberhalb des Beginns von Exon 2 an Position 2541 (AF527839) des Gens.

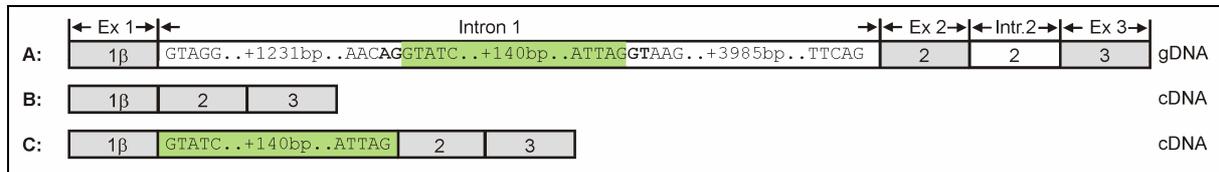


Abbildung 40: Schematische Darstellung des 150 bp-Inserts aus Intron 1

Der in der genomischen Sequenz (A) grün hinterlegte Bereich in Intron 1 wurde durch Nutzung der fett gedruckten Spleißstellen fälschlicherweise eingespleißt (C). In dem von uns identifizierten Transkript fehlte zusätzlich das Exon 3. (B) zeigt ein normales Spleißprodukt.

Zwei Produkte zeigten ein eigenartig verändertes Exon 3, bei dem 56 bp in der Mitte des Exons fehlten. Dabei entsprach der Anfang des Exons grundsätzlich dem der $\beta 3$ -Form. Nach 64 Basen, am Startpunkt der $\beta 4$ -Form des Exons 3, wurde dann abgespleißt und 56 bp ausgelassen. Die letzten 29 Basen des Exons 3 wurden jedoch wieder eingespleißt (Abb. 41).

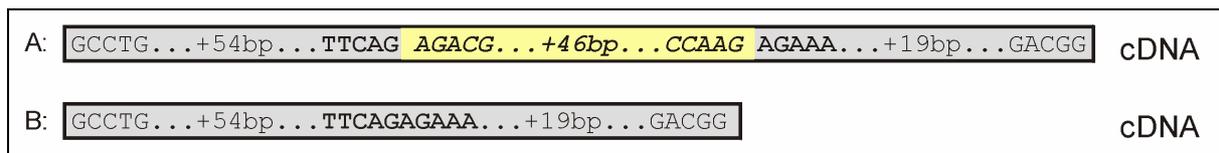


Abbildung 41: Schematische Darstellung der 56 bp-Deletion in Exon 3

Dargestellt ist die Basenabfolge der Variante 3 des Exons 3. Der gelb hinterlegte Bereich im Exon 3 (A) ging bei der Spleißvariante verloren (B).

7.5.3.2 614 bp- β -Produkte

Die Transkripte der Patientin H177 wurden hierbei den Transkripten des Probanden V2 gegenübergestellt, welcher keine der bei der Patientin beobachteten Intronvarianten (siehe 7.5.1) zeigte.

Sowohl von der Patientin als auch vom Probanden V2 konnten 19 Sequenzen ausgewertet werden.

7.5.3.2.1 Häufigkeitsverteilung der alternativen Exon 3-Formen

Bei der Patientin H177 war die β 3-Form vor der β 1-Form am häufigsten. Die β 2-Transkripte waren bei dem Probanden V2 besonders häufig (Tab. 27).

Tabelle 27: Alternative Exon 3-Formen bei den 614 bp- β -Produkten (H177 und V2)

Es konnten jeweils 19 von 20 klonierten Sequenzen ausgewertet werden und den verschiedenen grundsätzlichen Spleißformen zugeordnet werden. Bei Deletion des Exons 3 ist keine Zuordnung möglich.

	β 1	β 2	β 3	β 4	kein Ex 3
H177 (n=19)	4 (21,1%)	2 (10,5%)	10 (52,6%)	1 (5,3%)	2 (10,5%)
V2 (n=19)	1 (5,3%)	10 (52,6%)	8 (42,1%)	0 (0%)	0 (0%)

7.4.3.2.2 Neue Spleißvarianten bei der Patientin H177 und dem Probanden V2

Zwölf von 19 Transkripten der Patientin H177 zeigten keine Auffälligkeiten. Wie bereits bei den kürzeren β -Produkten zeigten 2 Transkripte einen isolierten Verlust des Exons 3 (siehe Abb. 39 F). Ein Überspringen des Exons 6 (siehe Abb. 39 H) wurde bei zwei β 1-Transkripten beobachtet. Zwei β 3- sowie eine β 2-Form wiesen eine alleinige Deletion des Exons 5 auf (siehe Abb. 39 G).

Bei 13 von 19 Transkripten des Probanden V2 wurden keine Auffälligkeiten beobachtet. Bei vier β 2-Transkripten kam es zu einer Deletion des Exons 2 (siehe Abb. 39 E). Wie bei der Patientin H177 zeigten auch bei dem Probanden V2 zwei β 3-Transkripten eine Deletion des Exons 6.

7.5.3.3 Zusammenfassende Betrachtung der β -Transkripte

Insgesamt konnten 12 neue Spleißvarianten der β -Transkripte beobachtet werden. Fasst man die Ergebnisse der Analyse der kürzeren (543 bp) und der längeren (614 bp) Produkte zusammen, so konnten bei Analyse von insgesamt 77 β -Transkripten 33 auffällige Transkripte gezählt werden. Zehn Spleißvarianten wurden von uns erstmals beschrieben und zwei Varianten waren bereits vorbeschrieben (Exon 1 β +237 bp, Yamaguchi et al., 2002; 150 bp-Insert aus Intron 1, Ohtsubo et al., 2000). Die Varianten traten bei den drei untersuchten Personen in unterschiedlicher Häufigkeit auf (Tab. 28). Zum Teil wurden auch Kombinationen der Varianten beobachtet.

Tabelle 28: Übersicht über die nachgewiesenen Spleißvarianten der β -Transkripte (H177, V1 und V2)

Bei den aufgetretenen Spleißvarianten ist in Klammer angegeben bei welcher grundsätzlichen Transkriptform (β 1-6, je nach Länge des Exon 3) sie gefunden wurden. Bei Verlust des Exon 3 kann das Transkript keiner dieser Formen zugewiesen werden. Die Variante mit um 3 bp verlängertem Exon 3 kann als β 1-Transkript mit verlängertem Exon 3 oder aber, wie von uns vorgeschlagen, als β 5-Form bezeichnet werden. Da auch Kombinationen von Spleißvarianten auftraten, entspricht die Summe der Häufigkeit der einzelnen Spleißvarianten nicht der Anzahl der auffälligen Transkripte.

Variante:	H177 543 bp	V1 543 bp	H177 614 bp	V2 614 bp
untersuchte Transkripte	19	20	19	19
normale Transkripte	9	10	12	13
auffällige Transkripte	10	10	7	6
Häufigkeit der Varianten:				
141 bp-Insert aus Intron 1	1 (1x β 5)	-	-	-
150 bp-Insert aus Intron 1*	-	2 (2x \emptyset Ex 3)	-	-
um 237 bp verlängertes Exon 1β**	6 (5x β 3; 1x β 5)	-	-	-
Deletion des Exons 2	-	-	-	4 (4x β 2)
Deletion des Exons 3	-	4	2	-
um 3 bp verlängertes Exon 3 (β5)	1	1	-	-
56 bp Deletion in Exon 3	-	2 (2x β 3)	-	-
Transkription der Introns 4+5	2 (2x β 4)	-	-	-
Transkription der Introns 5+6	1 (1x β 4)	-	-	-
Deletion der Exons 3-6	1	3	-	-
Deletion des Exons 5	-	-	3 (1x β 2; 2x β 3)	-
Deletion des Exons 6	-	-	2 (2x β 1)	2 (2x β 3)

* Variante vorbeschrieben durch Ohtsubo et al., 2000; ** Variante vorbeschrieben durch Yamaguchi et al., 2002

Die bekannten grundsätzlichen Transkriptvarianten 1-4 zeigten eine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung (Tab. 29). Auch Spleißfehler traten bei diesen Formen unterschiedlich häufig auf, wobei die β 4-Form am häufigsten betroffen war.

Tabelle 29: Verteilung der Exon 3-Formen der β -Transkripte und Anzahl der auffälligen Formen
 Untersucht wurden 77 einklonierte Sequenzen der Patientin H177 (je 19 543 bp- und 614 bp-Produkte) und der Probanden V1 (20 543 bp-Produkte) und V2 (19 614 bp-Produkte), die dann den bekannten grundsätzlichen Transkriptformen β 1-4 zugeordnet wurden. In der Zeile darunter ist aufgeführt, wie häufig diese grundsätzlichen Formen zusätzliche Spleißvarianten aufwiesen. Die von uns erstmals beschriebene β 5-Form wurde hier als auffällige β 1-Form (um 3 bp verlängerte Variante 1 des Exon 3) gewertet.

Transkript	β1	β2	β3	β4	kein Exon 3
Anzahl gefundener Transkripte (n=77)	9 (11,7%)	16 (20,8%)	37 (48,0%)	5 (6,5%)	10 (13,0%)
Anzahl auffälliger Transkripte pro Form	4 (44,4%)	5 (31,3%)	11 (29,7%)	3 (60%)	2 (20%)

8 Diskussion

Erst seit wenigen Jahren ist bekannt, dass biallelische Alterationen im *MYH*-Gen, dessen Genprodukt im Rahmen der Basenexzisionsreparatur an der Reparatur oxidativ bedingter Genomschäden beteiligt ist, zur Ausbildung einer adenomatösen Polyposis prädisponieren. Obgleich die genetischen und molekularen Grundlagen der *MYH*-assoziierten Polyposis heute bekannt sind, können viele Fragen noch nicht endgültig beantwortet werden. So sind die Häufigkeitsverteilung und die Pathogenität der verschiedenen *MYH*-Mutationen, der Krankheitsverlauf und der Phänotyp bei biallelischer *MYH*-Mutation, die Relevanz der MAP in der täglichen Praxis sowie die Bedeutung monoallelischer Mutationen weiterhin Gegenstand des wissenschaftlichen Diskurses. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit auch bisher wenig beachtete Aspekte, wie das komplexe Spleißen der primären *MYH*-Transkripte, der Einfluss von Intronpolymorphismen auf diese Spleißprozesse und die Konsequenzen dieser Spleißvorgänge für die von den jeweiligen mRNAs translatierten Proteine, untersucht.

8.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

In verschiedenen Untersuchungen wurde im Laufe der letzten Jahre nach *MYH*-Keimbahnmutationen gefahndet. Am häufigsten wurden aufgrund des bekannten milden Polyposis-Phänotyps bei biallelischer *MYH*-Inaktivierung negativ auf *APC*-Mutationen getestete FAP- oder AFAP-Patienten gezielt aus großen Polyposisregistern ausgewählt und untersucht (Sieber et al., 2003; Sampson et al., 2003; Nielsen et al., 2005; Isidro et al., 2004; Alhopuro et al., 2005; Aretz et al., 2006). Andererseits wurden auch jüngere Patienten aus großen Kolonkarzinomdatenbanken untersucht (Enholm et al., 2003; Croitoru et al., 2004; Fleischmann et al., 2004). Gelegentlich stellte man diesen selektierten Patienten noch einzelne Gruppen von Patienten ohne bekannte Darmerkrankung gegenüber (Wang et al., 2003; Gismondi et al., 2004).

Dagegen wurde in der vorliegenden Studie prospektiv ein unselektiertes gastroenterologisches Patientenkollektiv untersucht, bei dem aus klinischer Indikation eine Koloskopie durchgeführt wurde. Hierdurch sollte die Prävalenz von *MYH*-Mutationen bei Patienten mit multiplen kolorektalen Polypen mit derjenigen bei Patienten mit nur wenigen Polypen, Normalbefund oder CED verglichen werden. Die Bedeutung *MYH*-assoziiierter Phänotypen in der täglichen Praxis sollte dadurch näher evaluiert werden. Durch die Betrachtung eines gemischten Patientenkollektivs mit relativ wenigen Polyposispatienten mit MAP-typischer Klinik wurden allerdings deutlich weniger Patienten mit biallelischer *MYH*-Inaktivierung identifiziert als in kleineren Studien mit selektierten Patienten (Jones et al., 2002; Sampson et al., 2003; Nielsen et al., 2005; Aretz et al., 2006). Dagegen war es möglich zuverlässigere Prävalenzdaten zu

erheben sowie die Häufigkeit von *MYH*-Mutationen bei Patienten ohne den typischen Polyposis-Phänotyp zu bestimmen. Die hieraus gewonnenen Daten können helfen Patientengruppen zu identifizieren, die möglicherweise von einer prädiktive Testung vor Ausbildung der typischen Polyposis profitieren könnten.

Die in vorangehenden Studien betrachteten Stichproben lagen zumeist im Bereich unserer 352 Patienten (Sieber et al., 2003; Gismondi et al., 2005), gelegentlich aber auch deutlich darunter (Isidro et al., 2004; Alhopuro et al., 2005; Russell et al., 2006). In Einzelfällen wurden über 500 (Enholm et al., 2003; Wang et al., 2004; Eliason et al., 2005) oder gar über 2000 Patienten (Croitoru et al., 2004) untersucht.

8.2 Häufigkeit von *MYH*-Keimbahnvarianten

8.2.1 Bestimmung der Allelfrequenz von Y165C und G382D

Träger biallelischer *MYH*-Hotspotmutationen konnten im koloskopisch untersuchten Gesamtkollektiv beziehungsweise bei den Risikopersonen mit kolorektalen Adenomen oder Karzinomen in einer Frequenz von 0,3% beziehungsweise 0,8% identifiziert werden. Monoallelische *MYH*-Hotspotmutationen konnten im untersuchten Gesamt- und Risikokollektiv bei 1,7% beziehungsweise 1,5% der Patienten gefunden werden.

8.2.1.1 Bestimmung der Allelfrequenz in der Normalbevölkerung

Die bei gesunden Probanden gefundene Allelfrequenz der beiden Hotspotmutationen von zusammen 0,89% (7.1.1) entspricht weitgehend den Ergebnissen anderer Studien. Diese gehen von einer Allelfrequenz von zusammen 0,86% (Görgens et al., 2006) bis 2% (Isidro et al., 2004) für Y165C und G382D aus. Entsprechend unserer Ergebnisse wurden in einer 107 Patienten umfassenden Kontrollgruppe einer englischen Studie ebenfalls zwei Y165C- und keine G382D-Variante gefunden (Sieber et al., 2003). In den weiteren von uns untersuchten Patientengruppen (Adenom- und Karzinompatienten, CED-Patienten) wurde, wenn auch seltener als die Y165C-Form, mehrfach die G382D-Mutation nachgewiesen. Dies lässt darauf schließen, dass die Y165C-Variante in unserer Region zwar am häufigsten vorkommt, die G382D-Mutation aber bei größerem Stichprobenumfang wohl auch in der gesunden Bevölkerung gefunden werden kann.

In der Schweiz und in Finnland wurden in Kontrollgruppen, die 100 beziehungsweise 424 gesunde Probanden umfassten, keine Mutationen gefunden (Russell et al., 2006; Enholm et al., 2003). Für Finnland wird davon ausgegangen, dass in der dortigen Bevölkerung *MYH*-Mutationen, wie auch *APC*-Mutationen, relativ selten sind (Enholm et al., 2003).

Die Patienten der Kontrollgruppen wurden im Gegensatz zu den von uns untersuchten Patienten bisher nur in relativ wenigen Studien koloskopiert (Wang et al., 2004; Gismondi et al., 2004). Die Untersuchung nicht koloskopierter Probanden kann jedoch durch Einschluss von Patienten mit einer bisher unentdeckten Polyposis zu falsch hohen Allelfrequenzen in der gesunden Kontrollgruppe führen.

8.2.1.2 Häufigkeit der Hotspotmutationen bei Patienten mit Adenomen und Karzinomen

Die Häufigkeit der Mutationen wurde in verschiedenen Patientengruppen (Patienten mit Adenomen und KRK, Patienten mit ausschließlich Adenomen oder KRK) bestimmt. Die Gruppe der Patienten mit Adenomen konnte noch unterteilt werden in Patienten mit unter 15 Adenomen oder mindestens 15 Adenomen. Die meisten Mutationen wurden in der Gruppe der Patienten mit über 15 Adenomen gefunden (7.1.2). So wurde in dieser Gruppe mit 8 Patienten signifikant häufiger als bei Darmgesunden und Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine der beiden Hotspotmutationen gefunden ($p=0,001$). Die Y165C-Mutation wies eine Allelfrequenz von 12,5% und die G382D-Variante eine Allelfrequenz von 6,25% auf. In vorangehenden Studien konnten bei Patienten mit über 15 beziehungsweise über 20 Adenomen teilweise Allelfrequenzen von über 20% für *MYH*-Mutationen (Aceto et al., 2004; Wang et al., 2004) gefunden werden.

In der Gruppe der Patienten mit weniger als 15 Adenomen wurde nur die G382D-Mutation mit einer Allelfrequenz von 0,5% gefunden. In unserer Untersuchung zeigte sich kein statistisch signifikant häufigeres Auftreten von *MYH*-Mutationen bei Vergleich sämtlicher Patienten mit Adenomen (1-40 Adenome) oder Karzinomen mit Darmgesunden oder CED-Patienten ($p=0,49$). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass *MYH*-Mutationen bei Patienten mit nur einzelnen Adenomen nicht häufiger sind als in der gesunden Normalbevölkerung. In einer italienischen Studie wurde für Patienten mit wenigen Adenomen (1-9) für Y165C und G382D zusammen eine Allelfrequenz von 1,1% ermittelt (Gismondi et al., 2004).

8.2.1.3 Häufigkeit der Hotspotmutationen bei Patienten mit CED

Die Allelfrequenzen von jeweils 0,5% für beide Mutationen (7.1.3) liegen im Bereich der Zahlen bei Darmgesunden und auch im Bereich der Kontrollgruppen anderer Studien (8.2.1.1). *MYH*-Inaktivierungen kommen nicht signifikant häufiger bei Patienten mit CED als bei gesunden Probanden vor ($p=0,86$). Da bisher noch keine größere Gruppe von Patienten mit CED auf *MYH*-Mutationen untersucht wurde, existieren keine Vergleichsdaten.

8.2.2 Häufigkeit weiterer Mutationen und ihre Bedeutung

Bisher konnten neben den beiden besonders häufigen Mutationen Y165C und G382D weltweit 45 weitere exonische Varianten gefunden werden, die aufgrund der resultierenden Phänotypen oder aufgrund der Mutationslage in einem für die Enzymfunktion essentiellen Genabschnitt als pathogen eingestuft werden (Tab. 30).

Tabelle 30: Übersicht der beschriebenen sehr wahrscheinlich pathogenen *MYH*-Mutationen

Angegeben ist, wie viele Allele der jeweiligen Mutationen bisher beschrieben wurden (Häufigkeit). Die Erstbeschreiber der Varianten werden ganz rechts erwähnt. Neben den in der Tabelle angegebenen Referenzen wurden auch die in den Arbeiten von Enholm et al., 2003; Croitoru et al., 2004; Truta et al., 2005; Kambara et al., 2004; Alhopuro et al., 2005, Bougen et al., 2006; Croitoru et al., 2007; De Ferro et al., 2007 nachgewiesenen Mutationen bei der Bestimmung der Häufigkeit der einzelnen Varianten berücksichtigt. Mutationen, die häufiger als zehnmals gefunden wurden, sind grau hinterlegt. Die Genort-Angaben beziehen sich auf die NM012222-Sequenz.

Exon	Mutation auf Genebene	Mutation auf Proteinebene	Mutationstyp	Häufigkeit	Erstpublikation
3	199_200delGT	S67fs	frame shift	1	Venesio et al., 2004
3	274 C>T	R83X	nonsense	2	Sieber et al., 2003
3	252delG	G84fs	frame shift	1	Sieber et al., 2003
3	267 G>A	W89X	nonsense	1	Kairupan et al., 2005
3	270 C>A	Y90X	nonsense	9	Jones et al., 2002
3	271 G>A	D91N	missense	1	Nielsen et al., 2005
4	340 T>C	Y114H	missense	2	Isidro et al., 2004
5	349 T>A	W117R	missense	1	Sampsonet al., 2003
5	379delC	Q127fs	frame shift	1	Ponti et al., 2005
5	411_416dupATGGAT	137insIW	in frame dup	3	Sieber et al., 2003
6	428 C>T	P143L	missense	1	Aretz et al., 2006
7	494 A>G	Y165C	missense	284	Al-Tassan et al., 2002
7	502 C>T	R168C	missense	1	Wang et al., 2004
7	503 G>A	R168H	missense	4	Isidro et al., 2004
7	512 G>A	R171Q	missense	1	Russell et al., 2006
8	544 G>T	E182X	nonsense	1	Eliason et al., 2005
8	586 C>T	Q196X	nonsense	1	Aretz et al., 2006
9	625 A>G	I209V	missense	2	Sieber et al., 2003
9	658 G>A	V220M	missense	1	Fleischmann et al., 04
9	679 C>T	R227W	missense	1	Fleischmann et al., 04
9	692 G>A	R231H	missense	4	Aceto et al., 2004
9	691 C>T	R231C	missense	2	Miyaki et al., 2005
9	694 G>T	V232F	missense	1	Sieber et al., 2003
9	697 C>T	R233X	nonsense	1	Nielsen et al., 2005
10	778 C>T	R260W	missense	1	Aceto et al., 2004

10	782_87dupCAGGAG	263insAG	in frame dup	1	Aretz et al., 2006
10	817delG	A273PfsX32	frame shift	1	Aretz et al., 2006
10	842C>T	P281L	missense	2	Aretz et al., 2006
11	898 C>T	Q300X	nonsense	1	Eliason et al., 2005
12	970 C>T	Q324X	nonsense	3	Sampson et al., 2003
12	1096 C>A	P366T	missense	1	Nielsen et al., 2005
12	1103delC	A368fs393X	frame shift	14	Sieber et al., 2004
12	1105delC	L369LfsX25	frame shift	12	Nielsen et al., 2005
12	1121 T>C	L374P	missense	1	Aceto et al., 2004
12	1129 C>T	Q377X	nonsense	7	Nielsen et al., 2005
13	1145 G>A	G382D	missense	221	Shinmura et al., 2000
13	1172 C>T	P391L	missense	12	Nielsen et al., 2005
13	1186_87insGG	E396fs437X	frame shift	12	Isidro et al., 2004
13	1234 C>T	R412C	missense	2	Fleischmann et al., 04
14	1375 G>A	A459T	missense	4	Fleischmann et al., 04
14	1391_93delIAGG	Q464X	nonsense	2	Kairupan et al., 2005
14	1395_97delGGA	466delE	inframe del	21	Gismondi et al., 2004
14	1396 G>T	E466X	nonsense	16	Jones et al., 2002
14	1419delC	S473fs	frame shift	1	Sieber et al., 2003
14	1423 G>A	A475T	nonsense	1	Kairupan et al., 2005
15	1435G>T	V479F	missense	1	Aretz et al., 2006
15	1452 G>C	Q484H	missense	1	Görgens et al., 2006

Um ausschließen zu können, dass solche selteneren *MYH*-Mutationen in unserem Kollektiv vorkommen, wurden die Exons 2-14 bei 16 Patienten untersucht. Da bisher in den Exons 1 α , 1 β , 1 γ und 16 keine und im Exon 15 nur in zwei Fällen wahrscheinlich pathogene Mutationen identifiziert wurden, wurde von uns auf eine Untersuchung dieser Exons verzichtet.

Bei keinem unserer sechs Patienten mit einer monoallelischen Hotspotmutation (7.2.1) konnte eine vorbeschriebene oder neue wahrscheinlich pathogene Mutation identifiziert werden. Bei neun weiteren Patienten mit mindestens neun kolorektalen Adenomen wurde ebenfalls keine Mutation gefunden (7.2.2). Wie in der übrigen europäischen Bevölkerung (Sieber et al., 2003; Gismondi et al., 2004; Nielsen et al., 2005; Russell et al., 2006) scheinen die Y165C- und G382D-Mutationen somit auch in Deutschland dominierend zu sein. Die Y165C-Mutation ist in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen mit bisher weltweit 284 identifizierten Allelen gegenüber 221 nachgewiesenen G382D-Allelen (siehe Tab. 30) insgesamt etwas häufiger. Dagegen scheint in nordamerikanischen Populationen die G382D-Form mit Allelfrequenzen um 0,7% deutlich häufiger als Y165C mit einer Frequenz von lediglich 0,3% zu sein (Croitoru et al., 2004; Eliason et al., 2005). In Indien, Pakistan oder Japan kommen die Y165C- und G382D-Varianten überhaupt nicht vor. Stattdessen dominieren die in der kaukasischen Rasse nicht vorkommenden E466X-, Y90X-, beziehungsweise R231C-Mutationen (Jones et al., 2002; Miyaki et al., 2005). Die Mehrzahl der selteneren Mutationen wurde bisher nur ein- oder zweimal gefunden (siehe Tab. 30). Dagegen sind in einzelnen, jedoch nicht in allen, beobachteten Regionen bestimmte Mutationen, die ansonsten keine

Rolle spielen, häufiger vorhanden. So machen die 466delE- und die E396fs437X-Formen in Südeuropa (Gismondi et al., 2004; Isidro et al., 2004; Aceto et al., 2004), sowie die P391L-Mutation in den Niederlanden (Nielsen et al., 2005) mit ungefähr 15% einen relevanten Teil der Mutationen aus. Ob es sich dabei im Einzelfall um sogenannte Founder-Mutationen handelt, oder ob Träger dieser Varianten von Urfamilien mit hohem Anteil an der Bevölkerung der jeweiligen Region abstammen, ist unklar. Unsere Ergebnisse legen dagegen nahe, dass andere als die Y165C- und G382D-Varianten in der südwestdeutschen Bevölkerung sehr selten sind. Eine andere Studie in Deutschland, die Patienten mit AFAP- oder mildem FAP-Phänotyp untersucht hat, zeigte jedoch, dass die beiden Hotspotmutationen in Deutschland wohl nur circa 2/3 der *MYH*-Mutationen ausmachen. Die restlichen verteilen sich auf 19 seltenere Varianten, wobei 1105 del C mit einem Anteil von 6,25% und 466 del E mit 7,1% häufiger vorkommen (Aretz et al., 2006). In einer kanadischen Arbeit machten die Y165C und die G382D Variante sogar nur ein Drittel der *MYH*-Mutationen aus (Croitoru et al., 2007). Die hohen Anteile von 43% und 33% für Y165C und G382D an allen bisher nachgewiesenen *MYH*-Mutationen (siehe Tab. 30) kann dadurch erklärt werden, dass in einem Teil der Studien nur gezielt nach diesen beiden Mutationen gesucht wurde.

8.2.3 Exonische und intronische Varianten unklarer Pathogenität

8.2.3.1 Häufigkeit und Bedeutung exonischer Genvarianten

Neben exonischen Varianten, welche in der Regel zu einer Funktionseinschränkung des Enzyms führen (8.2.2), existieren weitere Varianten, von denen nicht sicher bekannt ist, ob eine relevante Reduktion der Enzymaktivität entsteht und sie damit als funktionell pathogen anzusehen sind (Tab. 31). Hierbei handelt es sich zumeist um Basenaustausche, die keine Änderungen der Aminosäuresequenz nach sich ziehen oder um Varianten, die sowohl unter klinisch erkrankten Patienten als auch unter gesunden Probanden relativ häufig vorkommen, und daher als Polymorphismen bezeichnet werden.

Tabelle 31: Übersicht der Varianten mit fraglicher pathogener Relevanz

Angegeben ist, wie viele Allele der jeweiligen Variante bisher beschrieben wurden (Häufigkeit). Sofern Allelfrequenz-Angaben existieren, wurden diese angegeben. Die Erstbeschreiber der Varianten werden ganz rechts erwähnt. Neben den in der Tabelle angegebenen Referenzen wurden auch die in den Arbeiten von Halford et al., 2003; Kambara et al., 2004 und Isidro et al., 2004 nachgewiesenen Häufigkeiten der Varianten berücksichtigt. Die Genort-Angaben beziehen sich auf die NM012222-Sequenz. Bei stillen Mutationen kommt es nicht zum Aminosäureaustausch.

Exon	Mutation auf Genebene	Mutation auf Proteinebene	Mutationstyp	Häufigkeit	Erstpublikation
1	42 C>T	I14I	stille Mutation	1 Fall	Aretz et al., 2006
2	235 C>T	P18L	missense	1 Fall	Shinmura et al., 2000
2	64 G>A	V22M	missense	2-10%	Shinmura et al., 2000
2	256 G>A	G25D	missense	1 Fall	Shinmura et al., 2000
3	210 C>T	Y70Y	stille Mutation	1 Fall	Al-Tassan et al., 2004
3	270 C>T	Y90Y	stille Mutation	2 Fälle	Alhopuro et al., 2005
5	408 C>T	T136T	stille Mutation	1 Fall	Aretz et al., 2006
9	672 C>T	N224N	stille Mutation	1 Fall	Aceto et al., 2004
10	827 G>A	C276W	missense	1 Fall	Fleischmann et al., 2004
10	883 C>T	R295C	missense	2 Fälle	Sieber et al., 2003
12	972 G>C	Q324H	missense	17-24%	Shinmura et al., 2000
12	996 G>A	S332S	stille Mutation	1 Fall	Kairupan et al., 2005
13	1234 C>T	R412C	missense	2 Fälle	Fleischmann et al., 2004
14	1571 G>C	T463T	stille Mutation	5 Fälle	Shinmura et al., 2000
14	1407 C>T	T469T	stille Mutation	1 Fall	Aretz et al., 2006
15	1452 G>C	Q484H	missense	1 Fall	Görgens et al., 2006
16	1502 C>T	S501F	missense	1-6%	Al-Tassan et al., 2004
16	1505 C>T	P502L	missense	1 Fall	Fleischmann et al., 2004
16	1559 G>A	R520Q	missense	1 Fall	Fleischmann et al., 2004

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Q324H-Variante viermal bei zwölf Adenompatienten (16,6% der Allele) und einmal bei vier Patienten ohne Adenome (12,5%) gefunden. Trotz der äußerst geringen Fallzahl liegen diese Häufigkeiten im Bereich der Allelfrequenzen anderer Studien. So wurden in verschiedenen Patientengruppen Allelfrequenzen von 11% (Görgens et al., 2006), 17% (Isidro et al., 2004), 21% (Sieber et al.,

2002) und 29% (Halford et al., 2003) gefunden, wobei jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen Studien- und Kontrollgruppen bestanden.

8.2.3.2 Häufigkeit und Bedeutung intronischer Genvarianten

Neben Alterationen innerhalb der Exons existieren auch Varianten der intronischen Basensequenz (Tab. 32).

Tabelle 32: Übersicht der bekannten Intronvarianten

Die Anzahl der beschriebenen Allele ist angegeben (Häufigkeit). Sofern Allelfrequenz-Angaben existieren, wurden diese angegeben. Neben den angegebenen Referenzen wurden auch in den Arbeiten von Croitoru et al., 2004; Kairupan et al., 2005; Miyaki et al., 2005; Kim et al., 2007 identifizierte Intronvarianten bei der Bestimmung der Häufigkeit der Varianten berücksichtigt. Die Genort-Angaben beziehen sich auf die AF527839-Sequenz.

Genort	Intronlage	Häufigkeit	Erstpublikation	Pathogenität
983 G>C	IVS 1 β +5	5	Yamaguchi et al., 2002	wahrscheinlich
989 C>T	IVS 1+11	7	Tao et al., 2004	unklar
2498 A>G	IVS 1+1520	1	Yamaguchi et al., 2002	unklar
4405 G>C	IVS 1+3427	1	Yamaguchi et al., 2002	unklar
6836 A>G	IVS 2+30	ca. 4%	Al-Tassan et al., 2004	unklar
6881 G>A	IVS 2+75	1	Al-Tassan et al., 2004	unklar
7795 G>A	IVS 3+11	1	Tao et al., 2004	unklar
7980 G>A	IVS 4-46	1	Aretz et al., 2006	unklar
8007 T>C	IVS 4-20	1	Al-Tassan et al., 2004	unklar
8026 G>A	IVS 4-1	1	Sampson et al., 2003	wahrscheinlich
8237 G>G	IVS 5-1	1	Aretz et al., 2006	wahrscheinlich
8314 G>A	IVS 6+35	7-62%	Shinmura et al., 2000	unklar
8635G>A	IVS 8+12	1	Al-Tassan et al., 2004	unklar
8644 C>A	IVS 8+21	ca.1,5%	Fleischmann et al., 2004	unklar
8681 G>A	IVS 8+58	ca.1,5%	Isidro et al., 2004	unklar
8684 T>A	IVS 8+61	ca.1,5%	Isidro et al., 2004	unklar
8509 G>A	IVS 8-1	1	Nielsen et al., 2005	wahrscheinlich
9034 A>C	IVS 10+3	14	Sampson et al., 2003	wahrscheinlich
9109 A>G	IVS 10-2	6	Tao et al., 2004	wahrscheinlich
9321 G>A	IVS 11-27	3	Al-Tassan et al., 2004	unklar
9349 C>T	IVS 11-9	1	Aretz et al., 2006	unklar
9584 G>T	IVS 12-57	ca.1,5%	Isidro et al., 2004	unklar
9639 A>G	IVS 12-2	1	Eliason et al., 2005	wahrscheinlich
9802 del30bp	IVS 13+25	1	Eliason et al., 2005	wahrscheinlich
10599 G>C	IVS 14-40	ca. 8%	Isidro et al., 2004	unklar
10601 A>G	IVS 14-38	1	Al-Tassan et al., 2004	unklar
10683 T>C	IVS 15+2	1	Aretz et al., 2006	wahrscheinlich
10708 G>A	IVS 15+27	1	Al-Tassan et al., 2004	unklar
11758 A>G	IVS 15-2	1	Wang et al., 2004	wahrscheinlich

Intronvarianten, die die hochkonservierten Basen der klassischen 5'- oder 3'-Spleißstellen verändern und nicht in homozygoter oder compound heterozygoter Form bei gesunden Probanden beobachtet wurden, werden als krankheitsverursachend angesehen. Schwierig ist dagegen die Bewertung von Varianten, die tief im Intron lokalisiert sind. Diese könnten durch

Zerstörung eines bisher unbekanntes Spleiß-Silencers, Generierung eines Enhancers (3.4.1) oder auch durch Bildung einer alternativen Spleißstelle trotzdem zu Fehlspleißen führen. Ein großer Teil dieser Intronvarianten kommt allerdings ähnlich häufig in Kontrollgruppen mit gesunden Probanden wie in Gruppen mit möglicherweise MYH-assoziierten Phänotypen vor. Neben den vorbeschriebenen Intronvarianten IVS 1 β +5 G>C, IVS 2+30 A>G, IVS 6+35 G>A wurden in unserer Untersuchung auch die bisher unbekanntes Varianten IVS 1 α +314 G>C; IVS 1 β +2900 T>G; IVS 1 β +3430 C>G detektiert.

Die seltene IVS 1 β +5 G>C-Variante wurde von uns erstmals in Kombination mit anderen Varianten bei einem Patienten mit multiplen Kolonadenomen gefunden (7.5.1). Die Variante wurde ursprünglich in einer Lungenkarzinomzelllinie beschrieben (Yamaguchi et al., 2002) und bisher bei drei Kolonkarzinom-, einem Ösophaguskarzinom-, einem Hautkrebspatienten aber auch bei vier gesunden Probanden in jeweils heterozygotem Zustand gefunden (Yamaguchi et al., 2002; Kambara et al., 2004). In einer kleinen Studie wurden Allelhäufigkeiten von 1,8 % bei gesunden Probanden (n=53) und 0,5% bei Patienten mit sporadischem kolorektalem Karzinom (n=92) ermittelt (Kambara et al., 2004), wobei diese durch die geringe Fallzahl als problematisch angesehen werden müssen.

Die IVS 2+30 A>G-Variante wurde von uns ebenfalls lediglich einmal bei nur 12 untersuchten Adenompatienten (über 25 Adenome oder über 9 Adenome und jünger als 70 Jahre) gefunden (7.2.3). Daraus ergibt sich bei eingeschränkter Aussagekraft bei Beobachtung einer kleinen Gruppe eine Allelhäufigkeit von 4,2%. In darmgesunden Kontrollgruppen anderer Studien konnten Allelhäufigkeiten von bis zu 4,9% beobachtet werden (Al-Tassan et al., 2004). Somit scheint diese Variante generell recht häufig zu sein, aber nicht häufiger bei Polyposispatienten als bei gesunden Personen vorzukommen. Darüber hinaus wurde die IVS 2+30 A>G-Variante auch schon in homozygoter Form bei gesunden Probanden beobachtet (Görgens et al., 2006), was gegen eine pathogene Bedeutung spricht.

Die Häufigkeit des IVS 6+35 G>A-Polymorphismus betrug in unserer Studie jeweils 12,5% in der Adenom- und der Kontrollgruppe (jeweils 20 Patienten) (7.3). In einer Gruppe von 292 darmgesunden Probanden wurde in einer vorangehenden Arbeit eine nahezu identische Allelfrequenz von 12,8% festgestellt (Al-Tassan et al., 2004). Bei Vergleich der Häufigkeit der Variante bei Kolonkarzinompatienten mit derjenigen bei gesunden Probanden wurde auch in bisherigen Untersuchungen kein signifikanter Unterschied wahrgenommen (Görgens et al., 2006). Somit scheint es sich auch hier um einen Polymorphismus ohne pathogene Relevanz zu handeln. Bei Betrachtung von Patienten mit multiplen (>10) Adenomen in Portugal wurde dagegen in 62,2% der Fälle die IVS 6+35 G>A-Variante gefunden (Isidro et al., 2004). Es bleibt also offen, ob die Variante nur bei den in unserer Studie unterrepräsentierten Patienten

mit multiplen Adenomen häufiger vorkommt, oder ob die Genvariante (A-Allel) in verschiedenen Volksgruppen ohne klinische Relevanz häufiger ist als das von uns als Normalform angesehene G-Allel. Die Tatsache, dass sowohl in unserer Studie als auch in anderen Studien (Görgens et al., 2006) der Polymorphismus teilweise bei gesunden Probanden homozygot vorlag, spricht gegen eine deutliche Funktionseinschränkung des Enzyms durch diese Variante.

Neu von uns entdeckt wurden drei weitere Genvarianten in Intron 1 (IVS 1 α +314 G>C; IVS 1 β +2900 T>G; IVS 1 β +3430 C>G), die allesamt nicht vorbeschrieben sind. Da das gesamte Intron 1 nur bei zwei Personen komplett sequenziert wurde, kann keine Aussage zu der Häufigkeit der Varianten getroffen werden.

Die Bedeutung der identifizierten Intronpolymorphismen für das Spleißen der Prä-mRNA wird in Abschnitt 8.4 diskutiert.

8.3 Phänotyp bei verschiedenen genotypischen Konstellationen

8.3.1 Inaktivierung beider Allele durch sicher pathogene Mutationen

Klassische Beispiele für diese Konstellation sind homozygot vorliegende G382D- oder Y165C-Mutationen sowie compound heterozygote Y165C/G382D-Genotypen. Allerdings scheinen auch genotypische Konstellationen mit mindestens einer der anderen wahrscheinlich pathogenen *MYH*-Mutation (siehe Tab. 30) deutlich häufiger vorzukommen als bisher vermutet (Aretz et al., 2006; Croitoru et al., 2007). Phänotypische Unterschiede bei biallelischer *MYH*-Inaktivierung durch verschiedene Mutationen wurden bislang nicht nachgewiesen.

8.3.1.1 Anzahl der Adenome bei MAP am Beispiel des Patienten H503

Eine biallelische *MYH*-Inaktivierung kann zu einem Phänotyp mit multiplen kolorektalen Adenomen führen (Al-Tassan et al., 2002; Jones et al., 2002). Über den Ausprägungsgrad und zeitlichen Verlauf dieser *MYH*-assoziierten Polyposis (MAP) wird aber weiterhin diskutiert.

Während *APC*-Keimbahnmutationen für einen Großteil der FAP-Fälle (>100 Polypen), jedoch nur für wenige AFAP-Fälle (10-100 Polypen) verantwortlich sind, sollen biallelische *MYH*-Inaktivierungen neueren Studien zufolge eine relevante Rolle bei der AFAP spielen und möglicherweise größeren Anteil an deren Entstehung haben als *APC*-Mutationen (Venesio et al., 2004; Nielsen et al., 2006; Bougen et al., 2007). So konnten bei 17-45% der *APC*-negativen AFAP-Patienten (Russell et al., 2006; Venesio et al., 2004), aber nur bei 7,5-13,2% der *APC*-negativen FAP-Patienten (Sieber et al., 2003; Alhopuro et al., 2005; Gismondi et al., 2005; Russell et al. 2006) biallelische *MYH*-Mutationen gefunden werden. Entsprechend

wurde die höchste Frequenz biallelischer *MYH*-Mutationsträger mit 16-42% bei Patienten mit 15-100 Adenomen beobachtet (Sieber et al., 2003; Gismondi et al., 2004; Isidro et al., 2004; Aretz et al., 2006). Bei 7-19% der Patienten mit über 100 Adenomen wurden ebenfalls biallelische *MYH*-Mutationen gefunden (Jones et al., 2002; Sampson et al., 2003; Wang et al., 2004; Aretz et al., 2006). In der von uns durchgeführten Untersuchung wies einer von acht Patienten mit über 15 kolorektalen Adenomen (12,5%) eine biallelische *MYH*-Mutation auf.

Deutlich seltener wurden hingegen weniger aggressive Phänotypen mit weniger als zehn Kolonadenomen sowie früh auftretende kolorektale Karzinome mit oder ohne wenige begleitende Adenome bei biallelischer *MYH*-Inaktivierung beobachtet (Enholm et al., 2003; Wang et al., 2004, Croitoru et al., 2004; Farrington et al., 2006). Klinische Bilder mit über 1000 Kolonadenomen wurden erst bei zwei Patienten gesehen (Isidro et al., 2004; Aretz et al., 2006).

Aus der Existenz dieser stark unterschiedlichen Phänotypen bei identischen Mutationskombinationen muss postuliert werden, dass andere genetische oder epigenetische Faktoren den Phänotyp mitbestimmen (Aceto et al., 2004). Denkbar wären hierbei eine Promotormethylierung oder zusätzliche Mutationen in anderen Genen. Betrachtet man jedoch die Krankengeschichte eines MAP-Patienten vom ersten Adenom an im zeitlichen Verlauf, so lässt sich feststellen, dass die beobachteten klinischen Manifestationen im Laufe des Patientenlebens konsekutiv und voneinander abgrenzbar aufeinander folgen können:

So wurde bei dem in unserer Studie identifizierten Patienten mit compound heterozygotem Y165C/G382D-Genotyp (7.4) im Jahr 1994 bei einer Sigmaresektion zufällig ein Sigmakarzinom (T1 N0 M0) auf dem Boden eines tubulovillösen Adenoms festgestellt. Bei Nachsorgekoloskopien bis zum Jahr 1999 wurden keine weiteren Adenome diagnostiziert. Bis 2003 wurden lediglich 7 weitere Adenome endoskopisch abgetragen. Danach wurde bei folgenden Kontrollen ein rascher Anstieg innerhalb kurzer Zeit neu entstandener Adenome beobachtet (Abb. 42). Somit kann unser Patient, je nach Beobachtungszeitpunkt, mehreren bekannten *MYH*-assoziierten Phänotypen zugeordnet werden. Während der Patient in der Zeit von 1994 bis 1999 lediglich ein *MYH*-assoziiertes früh auftretendes kolorektales Karzinom ohne begleitende Polypen aufwies, konnten bis 2002 nur wenige Adenome gefunden werden. In der Zeit von 2003 bis 2007 lag eine *MYH*-assoziierte AFAP vor und seit 2007 handelt es sich um eine *MYH*-assoziierte FAP. Durch genauere Betrachtung von in anderen Arbeiten erhobenen klinischen Daten lässt sich auf ähnliche Verläufe schließen (Aretz et al., 2004; Jenkins et al., 2005). Allerdings ist der zufälligen Entdeckung des Karzinoms bei unserem Patienten zu verdanken, dass aufgrund der Kontrolluntersuchungen erstmals der zeitliche

Erkrankungsverlauf eines MAP-Patienten von einem einzelnen KRK bis zu einem Bild mit multiplen Adenomen klinisch gut dokumentiert werden konnte (Abb. 42).

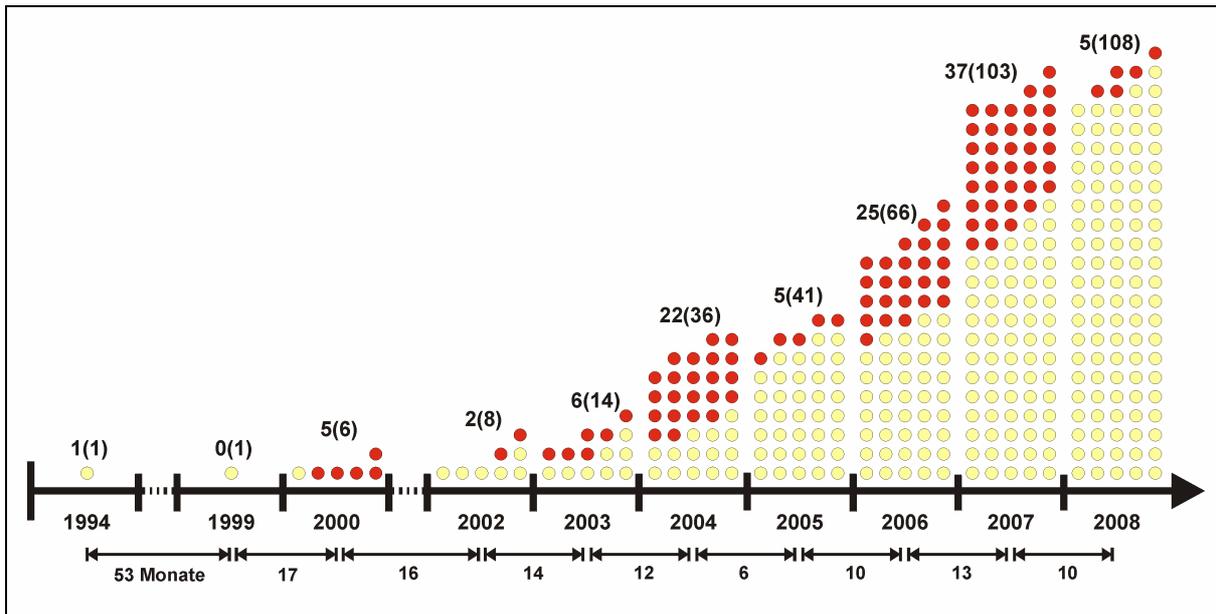


Abbildung 42: Anzahl der im Verlauf bei dem Patienten H503 pro Jahr entfernten Adenome

Dargestellt sind die seit Diagnose des kolorektalen Karzinoms im Jahr 1994 abgetragenen Adenome. Jeder Kreis symbolisiert ein Adenom. Neu hinzugekommene Adenome sind rot dargestellt, die bereits in vorhergehenden Untersuchungen abgetragenen Adenome und Karzinome sind gelb dargestellt. Über den Säulen ist jeweils die Zahl der neuen Adenome und in Klammer die Zahl der bisher insgesamt abgetragenen Adenome angegeben. Die Abstände zwischen den einzelnen Untersuchungen sind unterhalb der Zeitachse angegeben. Im Jahr 2004 erfolgten drei Untersuchungen im Abstand weniger Wochen.

Die bei dem Patienten mit biallelischer *MYH*-Inaktivierung im Verlauf beobachtete Zunahme der Zahl neu entstehender Adenome könnte sich folgendermaßen erklären lassen:

Durch den ständig auf die Erbinformation einer Darm-Stammzelle einwirkenden oxidativen Stress entsteht in verschiedensten Genen dieser Zellen kontinuierlich 8-oxoG. Dieses wird jedoch zumeist durch die Aktivität von OGG1 wieder entfernt bevor die gefährliche Fehlpaarung mit Adenin stattfinden kann. Ein sehr kleiner Anteil des 8-oxoG entgeht jedoch immer der Entfernung und führt bei ausgefallener oder stark eingeschränkter MYH-Funktion über die Fehlpaarung mit Adenin zu den typischen G:C→T:A-Mutationen (3.2.3). Die so entstehenden somatischen Mutationen betreffen auch die für die kolorektale Adenom- und Karzinomentstehung verantwortlichen Gene (3.1.2 und 3.3.7). Im Laufe des Lebens weisen immer mehr Darm-Stammzellen von Patienten mit weitgehend ausgefallener MYH-Funktion Mutationen in diesen Genen auf (Abb. 43). Das erste Adenom entsteht, wenn die erste Stammzelle, oder eine der teilungsfähigen Zellen der nächsten Generationen, das zur Adenomentstehung nötige Mutationsmuster, nach heutiger Vorstellung mindestens die Inaktivierungen beider *APC*-Allele (Powell et al., 1992), aufweist (Abb. 43). Mit steigendem Lebensalter liegen immer mehr Stammzellen mit einem defekten *APC*-Allel vor und geben

dieses an die Tochterzellen weiter. Damit wird es immer wahrscheinlicher, dass eine weitere durch MYH-Ausfall bedingte *APC*-Mutation, oder aus anderen Gründen auftretende *APC*-Mutation, in der Stammzelle selbst oder einer noch teilungsfähigen Tochterzelle das zweite *APC*-Allel inaktiviert. Die erste Mutation muss in einer langlebigen Stammzelle stattfinden, da ansonsten aufgrund der kurzen Lebensdauer und begrenzten Teilungsfähigkeit der Tochterzellen nicht genügend Zeit für die zur Adenomentstehung nötigen, zweiten Mutation bleibt.

Dagegen ist es in jüngerem Lebensalter bei biallelischer *MYH*-Mutation wahrscheinlicher, dass zunächst eine der Stammzellen mit noch zwei unbeschädigten *APC*-Allelen betroffen ist und damit vorerst aus dieser Zelle kein Adenom entsteht (Abbildung 43 A). Gemäß dem Zufallsprinzip ist es aber auch möglich, dass, eine Zelle bereits in jungem Lebensalter zwei *APC*-Mutationen anhäuft und ein Adenom entsteht (Abb. 43 B).

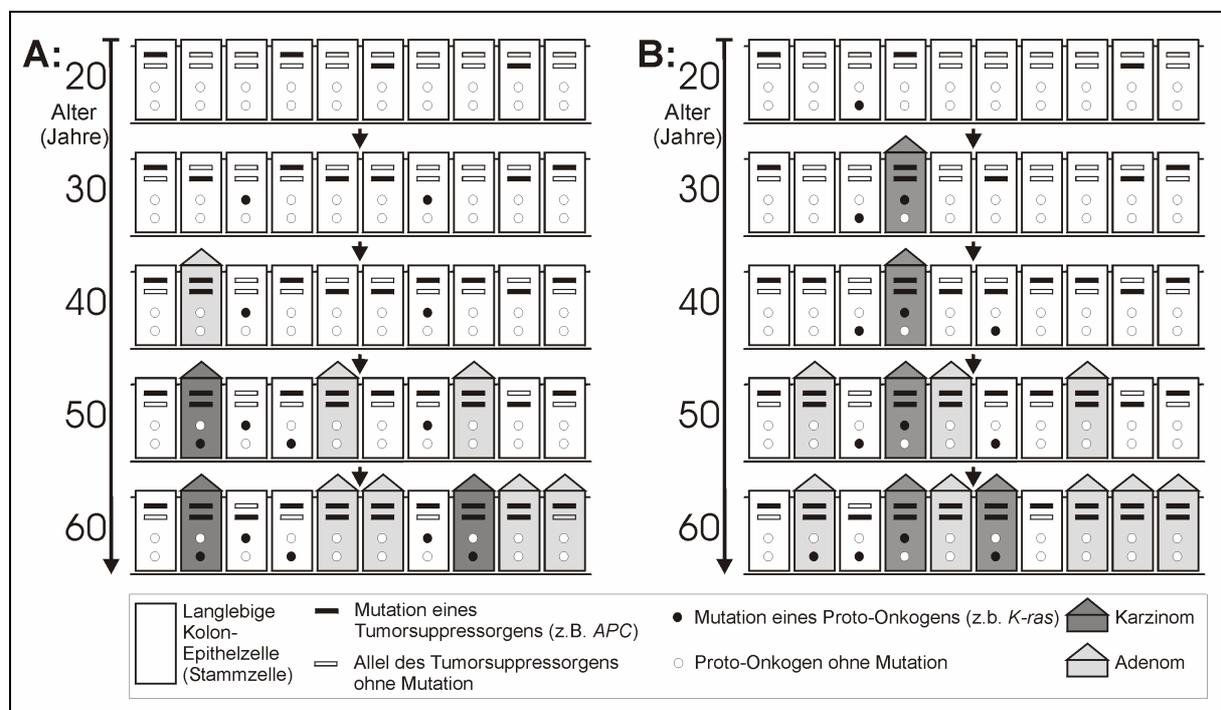


Abbildung 43: Schema zur Adenomentstehung bei biallelischer *MYH*-Mutation

Dargestellt sind 10 Kolon-Stammzellen mit jeweils zwei Allelen zweier in die kolorektale Karzinogenese involvierter Gene. Es wird von einer biallelischen *MYH*-Keimbahnmutation ausgegangen. Im Zeitverlauf kann es zu unterschiedlichen durch die *MYH*-Inaktivierung bedingten Schädigungsmustern kommen. Mit zunehmendem Lebensalter wird es immer wahrscheinlicher, dass eine durch *MYH*-Ausfall bedingte *APC*-Mutation (dunkel ausgefülltes Allelsymbol) eine Zelle mit bereits inaktiviertem ersten *APC*-Allel betrifft und zur Adenomentstehung (hellgrau markierte Zellen) führt. Dabei nehmen wir an, dass der Verlust des ersten Allels in langlebigen Stammzellen stattfinden muss, das zweite Allel kann auch in den nur wenige Male teilungsfähigen Tochterzellen verloren gehen. Bei zusätzlicher Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen infolge des *MYH*-Ausfalls kommt es zur malignen Entartung (dunkelgrau markierte Zellen).

Unter (A) ist ein typischer MAP-Verlauf mit Entstehung multipler Adenome, die im Verlauf maligne entarten können, beschrieben. In (B) ist der seltenere Verlauf mit einem frühzeitig auftretenden solitären Karzinom und erst einige Jahre später entstehenden multiplen Adenomen dargestellt.

Welche Polypenzahl ein Patient maximal erreicht, könnte durch zusätzliche Faktoren beeinflusst werden. So könnten unterschiedliche Ausmaße an oxidativem Stress, die individuelle Ausbildung von Systemen die schädliche Radikale des Sauerstoffs abfangen bevor Basenläsionen entstehen oder die Funktion kompensatorischer DNA-Reparaturwege eine Rolle spielen. Die gleichen Faktoren sollten auch den Zeitpunkt der Entstehung der MAP mitbeeinflussen. Diese scheint im Mittel im Alter von 48-56 Jahren diagnostiziert zu werden (Gismondi et al., 2004; Sampson et al., 2003; Sieber et al., 2003; Russell et al., 2006). Dieses Alter entspricht dem Zeitpunkt ab dem es zum sprunghaften Anstieg der Adenomzahl bei unserem MAP-Patienten gekommen ist. Ein Beginn unter 30 Jahren ist eher untypisch (Wang et al., 2004). Dieses im Vergleich zur klassischen *APC*-positiven FAP (ein defektes *APC*-Allel in der Keimbahn) deutlich höhere Diagnosealter hängt damit zusammen, dass bei der MAP immer zwei *APC*-Mutationen in einer Zelle neu entstehen müssen, bevor eine Adenom-Sequenz eingeleitet wird. Dass die Mehrzahl der Patienten erst im AFAP-Stadium diagnostiziert wird, beruht am ehesten darauf, dass einzelne kleine Polypen meist symptomlos sind, und oft erst nach Größenprogredienz oder maligner Entartung klinische Beschwerden auftreten. Vorsorgekoloskopien werden in der Regel erst ab 55 Jahren, und somit zumeist deutlich nach Manifestation der MAP, angeboten. Umgekehrt wird die klinische Bedeutung von bis zu 10-15 Polypen in relativ jungem Alter häufig noch verkannt und keine genetische Diagnostik angestrebt, beziehungsweise die noch relativ wenig bekannte MAP nicht in die differentialdiagnostischen Überlegungen einbezogen.

Zusammenfassend gehen wir also davon aus, dass die MAP zunächst mild beginnt, es dann im weiteren Verlauf aber zu einem raschen Anstieg der Zahl jährlich neu entstehender Adenome kommt. Die bei MAP beschriebenen unterschiedlichen Polypenzahlen sollten damit entgegen der bisherigen Annahme eher verschiedene Beobachtungszeitpunkte eines ansonsten weitgehend identischen Krankheitsverlaufs als interindividuell unterschiedliche Phänotypen bei biallelischer *MYH*-Mutation darstellen.

8.3.1.2 Maligne Entartung der MYH-assoziierten Adenome

Nur ein Teil der frühen kolorektalen Adenome mit zumeist nur leichten Epitheldysplasien entartet über die Zwischenstufen der mittelgradigen und schweren Epitheldysplasie zum kolorektalen Karzinom. Dieser Prozess dauert bei sporadischen Adenomen in der Regel zwischen fünf und 20 Jahren (Stryker et al., 1987) und ist mit einer Akkumulation von somatischen Mutationen in einer Vielzahl von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen verbunden (Vogelstein et al., 1988). Hierbei steigt die Häufigkeit höhergradiger Epitheldysplasien mit der Größe (Gschwantler et al., 2002). Durch die *MYH*-Insuffizienz bei

Patienten mit biallelischer *MYH*-Mutation entstehen auch in den Genen, welche zur malignen Entartung von Adenomen führen, häufiger Mutationen (3.1.2 und 3.3.7). So konnten in MAP-Adenomen beispielsweise gehäuft *MYH*-assoziierte G:C→T:A-Mutationen im *K-ras* Gen nachgewiesen werden (Lipton et al., 2003). Daher könnte man erwarten, dass bei MAP die Wahrscheinlichkeit und Geschwindigkeit des Adenom-Progresses zum Karzinom im Vergleich zu sporadischen oder FAP-assoziierten Adenomen steigen.

Die Dysplasiegrade von 37 entfernten und histologisch untersuchbaren Adenomen des Patienten H503 wurden mit denjenigen von 469 Adenomen der 107 Patienten mit Adenomen aber ohne biallelische *MYH*-Mutation verglichen. Bei dem MAP-Patienten zeigten sich signifikant häufiger mittelschwere und schwere Dysplasien (24,3% gegenüber 4,1%; $p < 0,001$). Diese traten im Gegensatz zu den Nicht-MAP-Patienten vorrangig bereits in unter 5mm großen Adenomen auf (Tab. 33).

Tabelle 33: Dysplasiegrad der Adenome des Patienten H503 in Abhängigkeit von ihrer Größe

Berücksichtigt sind alle abgetragenen Adenome, von denen Größe und Lokalisation bekannt sind und die nach einheitlicher Nomenklatur histologisch untersucht wurden.

	<5mm	5-10mm	>10mm	
Leichte Dysplasie	25	1	2	28
Mittlere Dysplasie	6	1	0	7
Schwere Dysplasie	0	1	1	2
	31	3	3	37

Allerdings hat unsere Untersuchung durch Analyse der histologisch untersuchbaren Adenome nur eines MAP-Patienten und somit Berücksichtigung nur eines Teils der tatsächlich entstandenen Adenome eine eingeschränkte Aussagekraft und kann daher nicht generell auf alle MAP-Patienten übertragen werden. Ähnliche Untersuchungen wurden bislang noch nicht bei größeren Gruppen von MAP-Patienten durchgeführt, sodass vergleichbare Daten fehlen.

Allgemein wird angenommen, dass nahezu alle MAP-Patienten im Laufe ihres Lebens ein KRK entwickeln (Nielsen et al., 2005; Farrington et al., 2005). Das Relative Risiko soll 200- bis 300-fach erhöht sein (Jenkins et al., 2006). Mehrfach wurden sogar bis zu 5 synchrone Karzinome gefunden (Sampson et al., 2003; Nielsen et al., 2005) und darüber hinaus gehäuft fortgeschrittenere Tumorstadien diagnostiziert (Nielsen et al. 2005; Aretz et al., 2006).

Fast 70% der bei biallelischer *MYH*-Inaktivierung gefundenen Karzinome entstanden vor dem 55. Lebensjahr, mit einem Anteil von 42,5% am häufigsten zwischen 40 und 49 Jahren (Nielsen et al., 2005).

Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass 1-3% aller kolorektalen Karzinome auf biallelische *MYH*-Mutationen zurückzuführen sind (Halford et al., 2003; Fleischmann et al., 2004).

8.3.1.3 Histologie und Verteilung der Neoplasien im Kolon

In nur wenigen Publikationen wurden bisher histologische Charakteristika der bei biallelischer *MYH*-Inaktivierung entstandenen Adenome wiedergegeben (Sieber et al., 2003; Lipton et al., 2003; O'Shea et al., 2008). Bei unserem Patienten H503 wurden vorrangig tubuläre (76%) und seltener tubulovillöse (24,%) Adenome gefunden. Allerdings waren auch bei den anderen Polypenpatienten unserer Untersuchung tubuläre Adenome am häufigsten (58% tubuläre, 20,7% tubulovillöse und 1,3% villöse Adenome), sodass es nicht möglich ist anhand der Histologie der Adenome auf eine MAP zu schließen. Die Ergebnisse vorhergehender Arbeiten stimmen mit unseren Beobachtungen überein. Auch konnten bisher weder charakteristische histologische noch immunhistochemische Kriterien der bei MAP-Patienten gefundenen kolorektalen Karzinome identifiziert werden (O'Shea et al., 2008).

Bei unserem MAP-Patienten wurde allerdings in mehreren Befunden unterschiedlicher Untersucher die flache Wuchsform der Adenome betont. Ob dieses Erscheinungsbild typisch für die MAP ist, oder einen Einzelfall darstellt, muss vorerst unklar bleiben, da in der Literatur nur sehr selten endoskopische Aspekte der Adenome wiedergegeben werden.

Unklar ist auch, ob die MAP mit einer Häufung von Adenomen in bestimmten Kolonabschnitten einhergeht. So existieren zu der bevorzugten Lokalisation der Adenome oder Karzinome im Kolon uneinheitliche Daten. Bei unserem Patienten H503 wurde eine Häufung von Adenomen im Colon ascendens beobachtet. Das Karzinom war jedoch im Sigma lokalisiert. Eine vorrangig rechtsseitige Akzentuierung der Adenome (Fornasarig et al., 2006; Aretz et al., 2006) oder Karzinome (Nielsen et al., 2005; Russell et al., 2006; Kanter-Smoler et al., 2006) wurde in mehreren Arbeiten beschrieben. Nur zwei Autoren vermuten dagegen eine vorrangig distale Lokalisation (Lipton et al., 2003; Fleischmann et al., 2004).

8.3.1.4 Extrakolonische Manifestationen der Erkrankung

Bei dem Patienten H503 wurden bisher noch keine Polypen des oberen Gastrointestinaltraktes festgestellt. Auch die anderen FAP-typischen extrakolonischen Manifestationen, die auch bei MAP vorkommen können (3.3.6), wurden bislang nicht beobachtet. Im Jahr 2005 wurden bei dem Patienten im Bereich der Gesichtshaut präkanzeröse Dyskeratosen, seborrhoische Keratosen sowie eine aktinische Lentigo entfernt. Obgleich Varianten der FAP oder des HNPCC mit Hautveränderungen einhergehen können und in Einzelfällen auch Hautläsionen (verkalkte Epitheliome, Pringle-Tumore), jedoch bisher immer andere als die bei unserem Patienten identifizierten, mit der MAP in Verbindung gebracht wurden (Ponti et al., 2005; Baglioni et al., 2005; Kumar et al., 2007), kann über die Ursache der Hauterscheinungen bei unserem Patienten nur spekuliert werden.

8.3.2 Monoallelische *MYH*-Mutationen und ihre Folgen

8.3.2.1 Karzinom- und Polyposisrisiko

Um feststellen zu können, ob monoallelische *MYH*-Mutationsträger ein erhöhtes Risiko haben, im Laufe ihres Lebens kolorektale Adenome oder Karzinome zu entwickeln, wurde die Häufigkeit monoallelischer Mutationen bei 131 Patienten mit kolorektalen Adenomen oder Karzinomen (7.1.2.1) mit der Häufigkeit monoallelischer Mutationsträger unter gesunden Probanden (7.1.1) verglichen. Dabei wiesen nur zwei (H003; H022) der Adenompatienten eine monoallelische *MYH*-Mutation auf. Dies entspricht einem Anteil von 1,5%. Ebenfalls zwei Mutationsträger (H308; H446) wurden unter 116 gesunden Probanden beobachtet, was einer Häufigkeit von 1,7% entspricht.

In unserer Studie konnte somit kein signifikant erhöhtes Adenom- oder Karzinomrisiko (OR 0,88) für Patienten mit einer monoallelischen *MYH*-Mutation gefunden werden. Eine Vielzahl von Studien mit teilweise deutlich höheren Fallzahlen zeigte dagegen mit relativen Risiken von 1,2-4,5 ein etwas erhöhtes, wenn auch nicht statistisch signifikantes, Risiko für die Entstehung von meist nur durch relativ wenige Adenome begleitete kolorektale Karzinome (Sampson et al., 2003; Sieber et al., 2003; Enholm et al., 2003; Wang et al., 2004; Croitoru et al., 2004; Fleischmann et al., 2004; Kambara et al., 2004; Farrington et al., 2006). In einer Metaanalyse der betreffenden Studien konnte ein statistisch signifikantes ($p=0,035$) 1,4-faches Neoplasierisiko ermittelt werden (Jenkins et al., 2006). Es muss also davon ausgegangen werden, dass Patienten mit monoallelischer *MYH*-Inaktivierung ein geringfügig erhöhtes Risiko für die Entstehung meist weniger Polypen mit potentielltem Entartungsrisiko tragen. Dass *MYH*-typische G:C→T:A Mutationen signifikant häufiger in kolorektalen Karzinomen von Patienten mit monoallelischen *MYH*-Mutationen als in sporadischen Karzinomen von Patienten ohne *MYH*-Mutation vorkommen (Kambara et al., 2004), spricht zusätzlich für eine klinische Relevanz der monoallelischen Varianten. In einer neueren Arbeit wird sogar ein identisches Karzinomrisiko für Träger monoallelischer und biallelischer *MYH*-Mutationen bei deutlich höherer Polypenzahl bei Patienten mit biallelischer Mutation postuliert (Olschwang et al., 2007).

Auch in unserer Studie wurde ein 80 Jahre alter Patient (H003) mit heterozygoter G382D-Mutation, bei dem 4 Adenome und ein KKR diagnostiziert wurden, identifiziert. Mehrere Erklärungsansätze für ein solches klinisches Bild können diskutiert werden:

Die Häufung von verschiedensten malignen Tumoren bei diesem Patienten und in seiner Familie (7.4), für die bisher keine *MYH*-Assoziation nachgewiesen werden konnte, könnten ein Hinweis dafür sein, dass den Adenomen, wie auch den übrigen Neoplasien, eine andere Ursache zugrunde liegt (Halford et al., 2004) und die *MYH*-Mutation ohne Bedeutung für die

Tumorentstehung ist. Für ein solches koinzidentelles Auftreten von *MYH*-Mutationen könnte sprechen, dass in einem Teil der bisher publizierten Arbeiten bei Untersuchung kolorektaler Adenome im Gegensatz zu den Beobachtungen von Kambara bei kolorektalen Karzinomen keine typischen G:C→T:A-Mutationen im *APC*-Gen gefunden wurden (Sieber et al., 2003; Halford et al., 2003). Allerdings schließt diese Beobachtung deren Existenz in bisher noch nicht identifizierten Tumorsuppressorgenen nicht aus. Zwar scheint eine solche Konstellation im Einzelfall möglich zu sein, das in der Metaanalyse festgestellte signifikant häufigere Vorkommen von monoallelischen *MYH*-Mutationen bei Patienten mit kolorektalen Neoplasien lässt sich mit diesem Ansatz allerdings nicht erklären.

Ein weiterer Erklärungsansatz ist der bereits von Sieber postulierte Verlust des gesunden, zweiten *MYH*-Allels in einer Körperzelle (Sieber et al., 2003). Somatische Punktmutationen in *MYH* sind zwar in Magenkarzinomen gefunden worden (Kim et al., 2004), scheinen aber in Kolonkarzinomen nicht vorzukommen (Halford et al., 2004) und sind daher als Ursache unwahrscheinlich. Allerdings soll das gesunde *MYH*-Allel durch den bei der Entstehung kolorektaler Karzinome relativ häufigen Verlust von Chromosom 1p (Lothe et al., 1995) verloren gehen (Sieber et al., 2003). Ein solcher 1p-Verlust wurde bei Patienten mit monoallelischer *MYH*-Mutation in einer Arbeit in bis zu 47% der untersuchten Adenome gefunden (Croitoru et al., 2004). In einer anderen Untersuchungen wurde dieser Verlust von 1p in kolorektalen Karzinomen von Trägern monoallelischer *MYH*-Varianten nicht beobachtet (Fleischmann et al., 2004). Gegen eine initiale Verursachung der Adenome bei monoallelischen *MYH*-Mutationsträgern durch LOH 1p spricht auch die Beobachtung, dass bei Adenomen biallelischer *MYH*-Mutationsträger oder bei Patienten mit *APC*-positiver FAP ein LOH 1p vorrangig erst im Laufe des Adenomprogresses beobachtet wurde (Cardoso et al., 2006). Ein weiterentwickeltes Modell geht deshalb davon aus, dass das gesunde *MYH*-Allel gemeinsam mit einem bisher unbekanntem Tumorsuppressor im Bereich von Chromosom 1p verloren geht (Kambara et al., 2004). Die Adenomentstehung würde somit auf dem Verlust der Funktion dieses Tumorsuppressorgens beruhen. Der Verlust der *MYH*-Funktion könnte dann höchstens einen möglicherweise vorhandenen schnelleren Progress der Adenome, nicht aber das gehäufte Auftreten von Adenomen bei Patienten mit monoallelischer *MYH*-Mutation erklären.

Die Analyse einer Tumorprobe unseres Patienten H003 mit einem KRK und 4 Adenomen ergab keinen Hinweis auf einen Verlust des gesunden Allels in den Tumorzellen (7.2.1.2). Da bei der Analyse der Tumorprobe allerdings auch in unterschiedlichem Ausmaß normale Zellen miterfasst werden können und ein Tumor aus mehreren Klonen bestehen kann, kann ein falsch negatives Ergebnis nicht ausgeschlossen werden.

Als Erklärung für ein höheres KRK-Risiko bei Trägern monoallelischer *MYH*-Mutationen könnte folgender Ansatz dienen:

Die große Menge ständig entstehender oxidativer DNA-Schäden verursacht auch in gesunden Organismen immer wieder Basenläsionen, die den ausgefeilten Reparaturmechanismen entgehen und zu Mutation, Proliferation und maligner Transformation führen (Loft, 1996; Marnett et al., 2000). Bei Vorliegen einer monoallelischen Y165C- oder G382D-Mutation sind die von dem defekten Allel stammenden Enzyme nahezu funktionslos (Al-Tassan et al., 2002). Die gleiche Menge ständig entstehender 8-oxoG:A-Fehlpaarungen (siehe 3.2.3) muss nun also durch die Hälfte der *MYH*-Glykosylasen entschärft werden. Ein häufigeres Entstehen von G:C→T:A Mutationen könnte die Konsequenz sein. Diese sammeln sich wie bei biallelischen Mutationsträgern, wegen der verbliebenen Aktivität des gesunden Allels jedoch in deutlich geringerer Zahl, im gesamten Genom und den KRK verursachenden Genen an (Abb. 44A). Die daraus resultierende geringere Wahrscheinlichkeit, dass eine teilungsfähige Darm-Stammzelle das zur Adenomentstehung benötigte Mutationsmuster entwickelt, könnte das klinische Bild mit meist nur einzelnen oder wenigen Adenomen oder Karzinomen (Enholm et al., 2003; Croitoru et al., 2004; Fleischmann et al., 2004) und einem höheren, mit sporadischen Karzinomen vergleichbaren, Erkrankungsalter bei monoallelischer Inaktivierung (Kambara et al., 2004) erklären. In einer kürzlich erschienenen Untersuchung wurden 300 Verwandte ersten Grades von 39 *MYH*-Mutationsträgern untersucht. Ein Vererbungsmuster, bei dem das Risiko biallelischer Mutationsträger höher ist als das monoallelischer Mutationsträger, deren Risiko aber wiederum höher ist als das von Menschen ohne Mutation passte besser zu den Ergebnissen als ein rein rezessiver Erbgang (Cardoso et al., 2006). Monoallelische *MYH*-Mutationen können somit als darmkrebsverursachende Varianten mit geringer oder unvollständiger Penetranz betrachtet werden (Peterlongo et al., 2006). Bei einem Teil der Patienten mit monoallelischen *MYH*-Mutationen kommt es dagegen im Laufe ihres Lebens in keiner teilungsfähigen Darmzelle zur Ausbildung eines Mutationsmusters, welches für eine Adenomentstehung benötigt wird und daher auch nicht zu Adenomen (Abb. 44B). Als Beispiel könnte hier die bereits 79 Jahre alte Patienten H446, bei der sich ein koloskopischer Normalbefund zeigte, herangezogen werden.

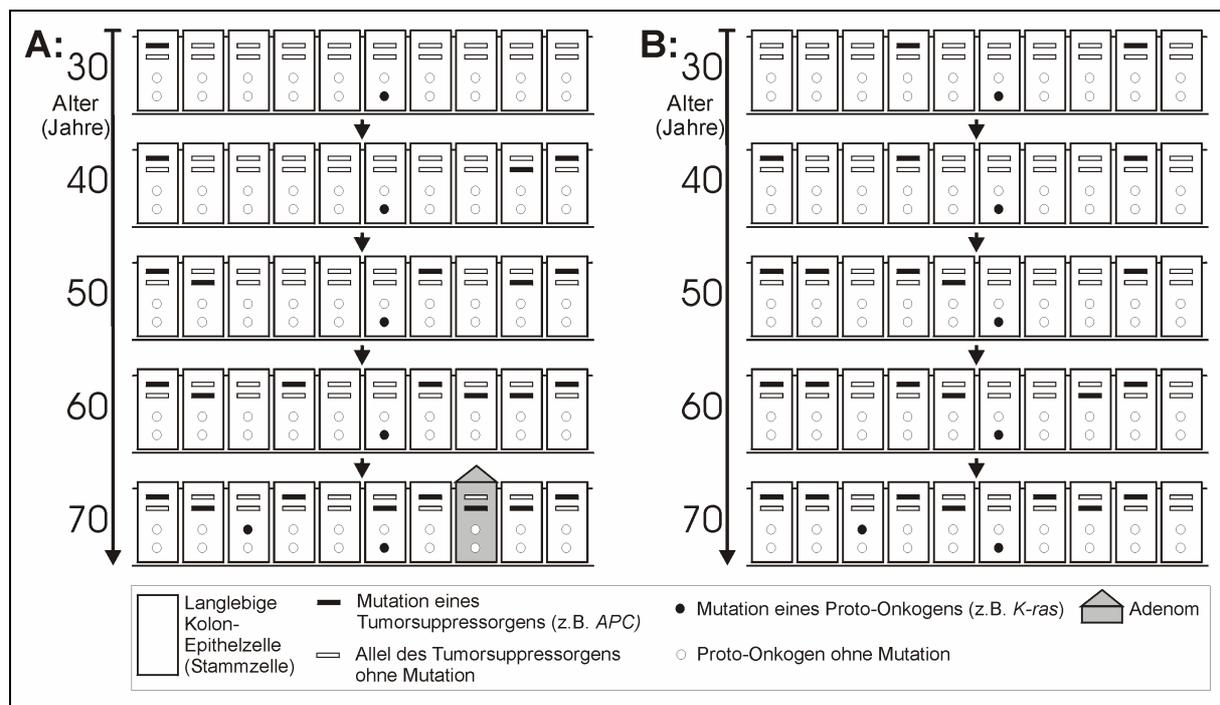


Abbildung 44: Theorie zur Adenomentstehung bei monoallelischer *MYH*-Mutation

Dargestellt sind 10 Kolon-Stammzellen mit jeweils zwei Allelen zweier in die kolorektale Karzinogenese involvierter Gene. Es wird von einer monoallelischen *MYH*-Keimbahnmutation ausgegangen. Im Zeitverlauf kann es bedingt durch eine eingeschränkte *MYH*-Reparaturaktivität bei monoallelischer Mutation zu unterschiedlichen Schädigungsmustern kommen. Mit zunehmendem Lebensalter wird es immer wahrscheinlicher, dass eine durch *MYH*-Aktivitätseinschränkung bedingte *APC*-Mutation (dunkel ausgefülltes Allelsymbol) eine Zelle mit bereits inaktiviertem ersten *APC*-Allel betrifft und zur Adenomentstehung (hellgrau markierte Zellen) führt. Dabei nehmen wir an, dass der Verlust des ersten Allels in langlebigen Stammzellen stattfinden muss, das zweite Allel kann auch in den nur wenige Male teilungsfähigen Tochterzellen verloren gehen. Unter (A) ist ein Verlauf dargestellt bei dem es bedingt durch die monoallelische *MYH*-Keimbahnmutation zur Adenomentstehung kommt. In (B) kommt es bei gleicher Ausgangssituation nicht zu einem zur Adenomentstehung nötigen Mutationsmuster und somit auch nicht zur Adenomentstehung.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wiesen Träger monoallelischer *MYH*-Hotspotmutationen bei Diagnose eines kolorektalen Karzinoms ein durchschnittliches Alter von $72,6 \pm 12,4$ Jahren auf (Colebatch et al., 2006). Fasst man die Ergebnisse mehrerer Studien zusammen (Sieber et al., 2003; Wang et al., 2004; Fleischmann et al., 2004; Croitoru et al., 2004; Colebatch et al., 2006), in denen jedoch teilweise gezielt Patienten mit früh aufgetretenem kolorektalem Karzinom untersucht wurden (Wang et al., 2004, Fleischmann et al., 2004), so kann ein durchschnittliches Diagnosealter von $62,3 \pm 12,7$ Jahren bei Trägern monoallelischer *MYH*-Hotspotmutationen ermittelt werden. Dementsprechend könnten auch die ermittelten relativen Risiken für die Entstehung eines KKK bei monoallelischer *MYH*-Mutation, in unserer (OR 0,88) wie auch vorhergehenden Arbeiten, durch Überrepräsentation relativ junger Probanden in der Kontrollgruppe (Durchschnittsalter von $54,7 \pm 16,2$ Jahren in unserer Arbeit) verfälscht sein, da diese aktuell gesunden Personen mit einer monoallelischen *MYH*-Mutation wahrscheinlich erst in höherem Alter kolorektale Adenome oder ein Karzinom entwickeln (Farrington et al., 2006). Nach dem hier vorgestellten Modell könnte

auch die Tatsache, dass die Proteine mit der G382D-Variante mehr Restaktivität besitzen als diejenigen mit der Y165C-Variante die Wahrscheinlichkeit der Adenomentstehung mitbeeinflussen. Dafür spricht, dass in einer Metaanalyse ein im Schnitt 5 Jahre früherer Erkrankungsbeginn bei Y165C-homozygoten Patienten im Vergleich zu G382D-homozygoten Patienten auffiel (Nielsen et al., 2005).

Selten wurden bisher Patienten mit AFAP- oder FAP-Phänotyp und monoallelischer *MYH*-Mutation gefunden (Sieber et al., 2003; Aceto et al., 2004; Nielsen et al., 2005). In diesen Fällen ist es am wahrscheinlichsten, dass der Polyposis eine andere Ursache zugrunde liegt oder in Wirklichkeit ein unerkannter biallelischer Mutationsstatus vorliegt. Mit unserem oder früheren Modellen zur Adenomentstehung bei monoallelischer *MYH*-Mutation sind solche Phänotypen jedenfalls nicht erklärbar.

8.3.2.2 Neoplasierisiko bei zusätzlichem exonischem Polymorphismus

Es wäre denkbar, dass auch Genvarianten wie der Q324H-Polymorphismus für ein leicht erhöhtes Adenomrisiko sorgen. Da Proteine mit Q324H-Variante lediglich einen 10-20%igen Abfall des die katalytische Effizienz eines Enzyms beschreibenden K_{cat}/K_m -Quotienten zeigen (Shinmura et al., 2000), ist es jedoch unwahrscheinlich, dass diese Variante allein eine Adenomentstehung bedingen kann. Darüber hinaus kommt die Variante bei Adenompatienten und gesunden Personen gleich häufig vor (7.2.3). Die Adenome der Patienten H190 und H345, die diesen Polymorphismus aufweisen, sollten eher auf anderen Ursachen beruhen.

Fällt aber die Hälfte der Enzymaktivität in einem Organismus bereits durch eine heterozygote Y165C- oder G382D-Variante aus, so könnte ein additiver Enzym-Aktivitätsverlust über eine Alteration des zweiten Allels durch die Q324H-Variante doch einen Krankheitswert besitzen. So könnten Adenome in etwas jüngerem Alter auftreten, größere Polypenzahlen entstehen oder die Wahrscheinlichkeit, dass überhaupt Adenome auftreten, erhöht werden. Voraussetzung ist natürlich, dass der Q324H-Polymorphismus nicht auf dem gleichen Allel wie die sicher pathogene Mutation liegt, was durch die normalerweise zur Mutationssuche eingesetzten Standardverfahren nicht geklärt wird.

Diese Theorie könnte die 19 schnellwachsenden Adenome bei unserem Patienten H022 erklären, welcher den Q324H-Polymorphismus neben der Y165C-Mutation zeigt (7.4). Dagegen spricht, dass die Patientin H091 bei G382D-Mutation und Q324H-Variante bisher noch keine Adenome aufweist. Diese ist allerdings erst 53 Jahre alt und könnte in Zukunft noch Adenome entwickeln. Da den Polymorphismen in der aktuellen Literatur nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt wird, liegen bisher noch keine Daten vor, die diese These unterstützen oder widerlegen könnten.

8.4 Bedeutung von Spleißvarianten der MYH-Prä-mRNA

Ziel war es herauszufinden, ob *MYH*-Intronvarianten zu Fehlspleißen und damit zur Entstehung eines relevanten Anteils nicht funktionsfähiger MYH-Glykosylasen und schließlich zu Adenom- und Karzinomentstehung führen können. Zusätzlich sollte geklärt werden, welche alternativen Spleißformen der primären MYH-Transkripte normalerweise entstehen, wie häufig die einzelnen Formen sind und welche Konsequenzen auf Proteinebene sich daraus ergeben.

Neben den bekannten alternativen Spleißvarianten des Exons 3 (siehe Abb. 27 und 28) wurde eine Reihe bisher unbekannter Transkripte (siehe Tab. 24) identifiziert, deren mögliche Bedeutung in den folgenden Abschnitten besprochen werden sollen.

8.4.1 Vorbeschriebene Spleißvarianten und ihre Bedeutung

Es ist bekannt, dass die primären MYH-Transkripte alternativ gespleißt werden und die Transkription an verschiedenen Stellen beginnen kann. So wurden bisher drei grundsätzlich unterschiedliche erste Exons (α , β , γ) und vier alternative Spleißvarianten des Exon 3 mit verschiedenen genutzten 3'-Spleißstellen identifiziert (Ohtsubo et al., 2000). In dieser Arbeit wurden die α - und β -Transkripte untersucht, die sich nur in ihrem ersten Exon unterscheiden (3.3.1). Während das Exon 1 α ein ATG enthält und die Basenabfolge dieses Exons damit auch translatiert wird, handelt es sich bei dem Exon 1 β um ein untranslatiertes Exon ohne Startkodon. Solche 5'-untranslatierten Exons kommen relativ häufig in eukaryotischen Genen vor (Zhang et al., 1998). Der Translationsstartpunkt für diese β -Transkripte liegt, wie auch der für die γ -Transkripte, am Beginn von Exon 2 und befindet sich im gleichen Leseraster wie das ATG in Exon 1 α (Abb. 45). Die α -Proteine weisen daher 14 zusätzliche N-terminale Aminosäuren bei ansonsten identischem Protein auf (Ohtsubo et al., 2000). Diese Aminosäuresequenz beinhaltet ein mitochondriales Lokalisationssignal (MLS), sodass die α -Form dem von Takao (Takao et al., 1999) aus Mitochondrien isolierten Typ1-Protein entsprechen sollte. Exon 2 enthält eine Kernlokalisationssequenz (NLS), weshalb die β -Transkripte für vorrangig kernlokalisierte Proteine (Typ 2) kodieren. Demnach sollten vorrangig Genvarianten, die das Spleißen der β -Formen stören und damit die Kernform der Glykosylase in ihrer Funktion einschränken zur Anhäufung von Mutationen in der Kern-DNA von Zellen führen, und deshalb eine Adenom- oder Karzinomentstehung begünstigen. Die γ -Transkripte, deren erstes Exon ebenfalls nicht translatiert wird, kodieren für identische Proteine wie die β -Transkripte und wurden deshalb in dieser Arbeit nicht untersucht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei den γ -Transkripten andere Spleißvarianten als bei den β -Transkripten entstehen.

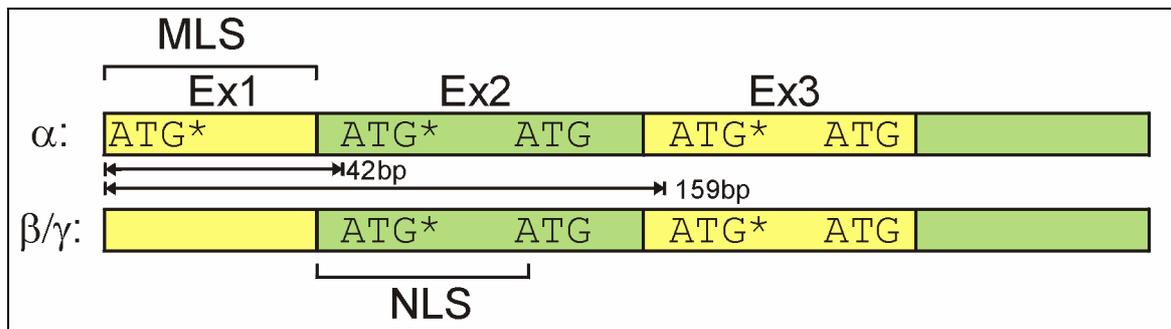


Abbildung 45: Mögliche Startkodons bei α -, β - und γ -Transkripten

Oben sind die α -Transkripte, unten die β - und γ -Transkripte dargestellt. Mögliche nutzbare Startkodons (ATG) sind eingetragen. Mit einem Stern versehen Startkodons liegen im korrekten Leseraster und bedingen unterschiedlich lange Proteine mit teilweise fehlenden 5'-Aminosäuren aber ansonsten identischer Aminosäureabfolge. Der Abstand zwischen diesen Startkodons in Exon 1 α , 2 und 3 ist durch Pfeile dargestellt. Wahrscheinlich wird meistens das jeweils erste mögliche ATG genutzt.

MLS: Mitochondriales Lokalisationssignal; NLS: Kernlokalisierungssignal.

Normalerweise startet die Translation eines Proteins immer vom ersten ATG der mRNA. Zu Ausnahmen von dieser Regel kommt es nur, wenn das erste Startkodon in einem suboptimalen Kontext liegt (Kozak, 1991). Ob bei einem Teil der α -Transkripte die Translation nicht am ersten ATG startet und somit auch hier das erste Exon und damit das *mitochondrial targeting signal* fehlt und nukleär lokalisierte, mit den β - und γ -Proteinen identische Enzyme entstehen (Ohtsubo et al., 2000), ist Gegenstand des wissenschaftlichen Diskurses. Da jedoch sowohl das in Exon 1 α vorliegende erste als auch das bei den β - und γ -Varianten genutzte zweite ATG einen vergleichbaren Kontext aufweisen, ist ein Start vom zweiten ATG bei den α -mRNAs eher unwahrscheinlich.

Unabhängig davon welches erste Exon genutzt wird, kommt es zu alternativem Spleißen des Exons 3, sodass die auch in unserer Arbeit nachgewiesenen bekannten Formen $\alpha 1$ - $\alpha 4$ und $\beta 1$ - $\beta 4$ entstehen (siehe Abb. 27 und 28). Bisher wurden alle Exon 3-Varianten, die bei α -Transkripten auftraten, auch bei den β -Transkripten gefunden (Ohtsubo et al., 2000; Yamaguchi et al., 2002).

Durch die unterschiedliche Länge der Exon 3-Varianten entstehen bei Translation der verschiedenen mRNAs auch unterschiedlich lange Proteine. Bei der Translation der $\alpha 1$ -mRNA entsteht ein 536 Aminosäuren langes Protein. Die $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Proteine sind durch Translation von mRNAs mit jeweils 30 bp beziehungsweise 33 bp kürzerem Exon 3 um 10 beziehungsweise 11 Aminosäuren verkürzt (Tab. 34). Zu einem Rasterschub kommt es in diesen Fällen nicht. Dagegen entsteht bei Translation der $\alpha 4$ -mRNA vom ersten ATG oder einem anderen im gleichen Leseraster befindlichen ATG aus (Abb. 45) ein Rasterschub mit resultierendem Stopkodon, Abbruch der Translation und Bildung eines wohl funktionslosen Proteins. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren verschiedene Möglichkeiten diskutiert, wie bei Einspleißen der Variante 4 des Exon 3 in eine mRNA unabhängig vom

genutzten ersten Exon (1 α ; 1 β oder 1 γ) ein funktionsfähiges Protein entstehen kann. Eine Translations-Reinitiation am zweiten ATG in Exon 3, bei der nach Abbruch der ersten Aminosäurenkette eine Untereinheit des Ribosoms an der mRNA gebunden bleibt um das nächstmögliche ATG aufzusuchen und dieses zur Produktion eines zweiten Proteins zu nutzen, ist aus unserer Sicht unwahrscheinlich. Ursache hierfür ist, dass die Fähigkeit zur Reinitiation von der Länge der ersten Aminosäurenkette abhängt. Diese ist in unserem Fall 55 Aminosäuren lang, eine Reinitiation der Translation soll aber nur bis zu einer Länge von 30 Aminosäuren effektiv sein (Kozak, 1999). Darüber hinaus würde bei Reinitiation an diesem ATG, das aber in einem anderen Leseraster liegt, ein komplett anderes Protein mit Ende in Exon 9 entstehen. Auch der von Ohtsubo (Ohtsubo et al., 2000) vorgeschlagene Transkriptionsstart am dritten ATG, welches sich in Exon 2 befindet, ist unwahrscheinlich, da die beiden davor liegenden ATGs einen deutlich besseren Kontext aufweisen. Darüber hinaus würde auch bei Translationsstart an diesem dritten ATG relativ schnell ein Stopkodon entstehen. Es muss also davon ausgegangen werden, dass aus dem α 4-Transkript kein funktionsfähiges Protein gebildet wird. Alle in diesem Kapitel zu den Exon 3-Varianten der α -Proteine getroffenen Aussagen lassen sich auf die von den β -Transkripten translatierten, 14 Aminosäuren kürzeren (Nutzung des ersten ATG in Exon 2, das sich im gleichen Leseraster wie das ATG in Exon 1 α befindet), Proteine übertragen.

Tabelle 34: Konsequenzen der alternativen Exon 3-Formen 1-4 auf Proteinebene

In der ersten Zeile ist die Länge (in bp mRNA) der jeweiligen Exon 3-Variante angegeben. In der zweiten Zeile ist die Länge der α -Proteine und in der dritten Zeile die Länge der β -Proteine mit der jeweiligen Exon 3-Variante angegeben. Bei Variante 4 kommt es im Falle der α -Proteine nach 53 und im Falle der β -Proteine nach 39 Aminosäuren (aa) zum Rasterschub (fs), sodass jeweils die Aminosäurenkette nach 55 beziehungsweise 41 Aminosäuren abbricht (STOP) und wohl nicht funktionsfähige Proteine entstehen.

Transkript	α/β 1	α/β 2	α/β 3	α/β 4
Exon 3	182 bp	del 30 bp	del 33 bp	del 97 bp
Protein α	546 aa	del 10 aa (536 aa)	del 11 aa (535 aa)	fs aa 53 STOP aa 55
Protein β	532 aa	del 10 aa (522 aa)	del 11 aa (521 aa)	fs aa 39 STOP aa 41

Ob die von den unterschiedlichen mRNAs (1-4) translatierten verschieden langen Proteine sich aber auch in ihrer Enzymaktivität unterscheiden, beziehungsweise ob jeweils eine der Formen in bestimmten zellulären Kontexten Vorteile gegenüber den anderen hat, ist bisher ungeklärt. Bisher konnte dem Exon 3-Bereich noch keine eindeutige Aufgabe zugeordnet werden, was die Beurteilung der Varianten erschwert. Die Substratspezifität scheint aber eher in weiter C-terminal gelegenen Regionen des Proteins repräsentiert zu sein (siehe 3.3.4). Warum bei Nutzung der Exon 3-Variante 4 eine mRNA entsteht, die wohl für kein

funktionsfähiges Protein kodiert, ist ebenfalls offen. Die Hauptmenge der α 4- und β 4-mRNA wird aufgrund des vorzeitigen Stopkodons möglicherweise bereits kurz nach Erstellung der mRNA aus dem Primärtranskript durch Nonsense-vermittelte RNA-Entsorgung (*Nonsense-mediated mRNA decay*; Byers, 2002) abgebaut. Dieser Mechanismus sorgt dafür, dass aus fehlerhafter mRNA weniger defekte Proteine translatiert werden. Hierdurch sollen ungünstige Folgen für die Zelle weitgehend vermieden werden. Somit wäre durch die Variante 4 höchstens eine Regulation der Enzymmenge auf mRNA-Ebene denkbar. Beweise für diese Theorie existieren nicht. Allerdings wurde mit einem solchen Ansatz bereits versucht das Einspleißen von Introns mit resultierendem Abbruch der Proteinsynthese zu erklären (Denhez und Lafyatis, 1994; Xie et al., 1991).

Die vier unterschiedlichen Exon 3-Varianten wurden bisher bei allen Arbeiten, die sich mit der MYH-mRNA beschäftigt haben, nachgewiesen (Ohtsubo et al., 2000; Yamaguchi et al. 2002). Daher kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um bei allen Menschen vorkommendes reguläres alternatives Spleißen zur Generierung von Enzymen mit unterschiedlichen Eigenschaften handelt und nicht um nur bei Einzelpersonen vorkommende Spleißfehler mit resultierenden funktionslosen Proteinen.

8.4.2 Neue alternative Exon 3-Formen

Neben den vorbeschriebenen Varianten 1-4 wurden von uns noch zwei weitere alternative Exon 3-Formen gefunden (Tab. 35). Diese wurden als Variante 5 und Variante 6 bezeichnet.

Tabelle 35: Konsequenzen der neuen Exon 3-Formen auf Proteinebene

Die Längenangaben beziehen sich auf Variante 1 des Exons 3. Es ist davon auszugehen, dass beide Varianten bei Untersuchung einer größeren Menge Transkripte sowohl bei den α - als auch bei den β -Transkripten nachgewiesen werden könnten.

Transkript	α/β 5*	α/β 6⁺
Exon 3	+3 bp am 5'-Ende	+9 bp am 5'-Ende
Konsequenz auf Proteinebene	+ 1 aa (ins A)	+ 3 aa (ins ACA)

* nur bei der β -Transkriptanalyse identifiziert; ⁺ nur bei der α -Transkriptanalyse identifiziert
(aa)= Aminosäuren; (bp)= Basenpaare

Die Variante 5 mit dem im Vergleich zur Variante 1 am 5'-Ende um 3 bp verlängerten Exon 3 wurde nur bei den β -Transkripten gefunden, das am 5'-Ende um 9 Basenpaare verlängerte Exon 3 nur bei den α -Transkripten. Dass bisher die Varianten 1-4 sowohl bei α - als auch bei β -Varianten gefunden wurden lässt vermuten, dass auch die Varianten 5 und 6 bei beiden Formen vorkommen. Es scheint sich jedoch um seltene Formen zu handeln, sodass zum Nachweis dieser These eine größere Anzahl Transkripte untersucht werden müsste.

Durch Translation der Spleißvarianten 5 und 6 entstehen Proteine mit einer beziehungsweise drei zusätzlichen Aminosäuren ohne Veränderungen im Leseraster. Dies spricht dafür, dass es sich auch hierbei um alternatives Spleißen mit Bildung funktionsfähiger Enzyme und nicht um Fehlspleißen handelt.

Während die Bezeichnung $\beta 5$ -mRNA von Ohtsubo für eine grundsätzliche $\beta 4$ -mRNA mit eingespleißtem 150 bp langem Pseudo-Exon aus Intron 1 (siehe Abb. 40) gewählt wurde (Ohtsubo et al., 2000), möchten wir eine andere Nomenklatur vorschlagen: Jedes Transkript sollte je nach erstem Exon als α -, β - oder γ -Transkript bezeichnet werden. Je nach alternativem Spleißen des Exons 3 wird die betreffende mRNA durch Anhängen der Bezeichnung der Exon 3-Form (1-4 vorherbeschrieben, 5 und 6 von uns neu identifiziert) an die Bezeichnung des ersten Exons definiert (siehe Abb. 28). Während jede MYH-mRNA einer dieser grundsätzlichen Transkriptformen zugeordnet werden kann, treten Spleißvarianten in anderen Bereichen des Gens, wie das von Ohtsubo beschriebene Einspleißen eines Pseudo-Exons, zusätzlich auf und sollten nach Größe der Insertion beziehungsweise Deletion und ihrer Lokalisation bezeichnet werden.

Auffällig ist, dass bei der Variante 5 des Exons 3 statt dem in bis zu 99% der Fälle vorliegenden AG (Positionen -2 und -1) an der 3'-Spleißstelle ein TG genutzt wird (Tab. 36). Darüber hinaus entspricht auch die davorliegende Sequenz nicht derjenigen einer typischen 3'-Spleißstelle (Tab. 36). Durch welche Mechanismen das Spleißen an dieser Stelle trotz des scheinbar suboptimalen Spleißsignals realisiert werden konnte, bleibt unklar. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre die Existenz von seltenen, von der häufig beobachteten Konsensussequenz abweichenden, aber trotzdem funktionierenden Spleißstellen. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass es sich im Falle der Spleißvariante 5 des Exons 3 um einen Fehler der Spleißmaschinerie handelt und es an dieser Stelle zu einem Spleißvorgang ohne Vorliegen eines entsprechenden Signals gekommen ist.

Tabelle 36: Konfiguration der verschiedenen 3'-Spleißstellen der Exon 3-Varianten

Die verschiedenen Spleißstellen wurden mit der von Zhang et al., 1998 veröffentlichten Konsensus-3'-Spleißstellensequenz verglichen. An den scheinbar besonders wichtigen Positionen -2 und -1 steht nahezu immer AG. Abweichungen von der Konsensussequenz sind grau hinterlegt.

	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
Konsensussequenz	C/T	C/T	C/T	C/T	N	C/T	A	G
Variante 1	C	T	G	T	G	C	A	G
Variante 2	G	G	C	C	C	C	A	G
Variante 3	C	C	C	A	G	C	A	G
Variante 4	C	T	A	T	T	C	A	G
Variante 5	A	G	C	C	T	G	T	G
Variante 6	A	T	G	C	A	C	A	G

8.4.3 Häufigkeitsverteilung der Exon 3-Varianten 1-6

Die beiden neu entdeckten Exon 3-Varianten 5 und 6 wurden nur in zwei Transkripten beziehungsweise einem Transkript gefunden und scheinen somit die bisher seltensten Exon 3-Varianten darzustellen. Aber auch die vorbeschriebenen Formen 1-4 weisen eine bestimmte Häufigkeitsverteilung auf. Diese soll unter anderem auch von dem untersuchten Gewebe abhängen (Ohtsubo et al., 2000). Darüber hinaus kommen die Exon 3-Varianten 1-4 bei α -, β - und γ -Transkripten in teilweise unterschiedlicher Häufigkeitsverteilung vor (Ohtsubo et al., 2000). Vergleicht man die 3'-Spleißstellen aller sechs Varianten mit der von Zhang ermittelten Konsensussequenz (siehe Tab. 36), so kann man zwischen den häufigen Formen 1-4 kaum Unterschiede erkennen. Alle weisen das CAG mit vorgeschaltetem Polypyrimidintrakt auf (Zhang et al., 1998). Unterschiedliche Häufigkeiten der Varianten 1-4 sollten daher nicht auf der Konfiguration der 3'-Spleißstellen beruhen. Im Falle der Varianten 5 und 6 ist nicht auszuschließen, dass die im Vergleich zur postulierten Konsensussequenz (Zhang et al., 1998) scheinbar nicht perfekt konfigurierte Spleißstelle das relativ seltene Vorkommen dieser Varianten mitbedingt.

Überraschenderweise war bei unseren Untersuchungen die wahrscheinlich funktionslose $\alpha 4$ -Variante die häufigste der α -mRNAs. Geringfügig seltener wurde die $\alpha 3$ -Variante detektiert, die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Formen waren deutlich seltener (siehe Tab. 25). In einer anderen Untersuchung wurden die $\alpha 3$ -Transkripte am häufigsten beobachtet, während die $\alpha 4$ -Formen sehr selten waren (Ohtsubo et al. 2000). Bei den β -Transkripten wurde von uns die wohl ebenfalls funktionslose $\beta 4$ -Variante am seltensten gefunden. Die Variante 3 war auch bei der MYH-Kernform häufiger als $\beta 2$ und $\beta 1$ (siehe Tab. 29). In der einzigen publizierten Arbeit, in der größere Mengen MYH-mRNAs analysiert wurden, war die $\beta 3$ -Form ebenfalls am häufigsten (Ohtsubo et al., 2000).

Es fällt auf, dass sowohl in unserer Untersuchung als auch in der von Ohtsubo durchgeführten Analyse bei den α - und β -Transkripten die Variante 3 die häufigste der wohl funktionsfähigen Formen 1-3 war. Man könnte daraus folgern, dass die Variante 3 sowohl im Kern als auch im Mitochondrium die Hauptform darstellt und die Gesamtzymmenge entsprechend den zellulären Anforderungen durch vermehrte oder verminderte Bildung der Spleißvariante 4, die wahrscheinlich durch *nonsense-mediated mRNA decay* abgebaut wird, reguliert wird. Beweise hierfür existieren allerdings nicht. Bei der Variante 3 des Exon 3 wurden von uns darüber hinaus sowohl bei den α - als auch bei den β -mRNAs am seltensten Spleißfehler beobachtet.

In unserer Analyse wurde neben den oben beschriebenen Exon 3-Varianten sowohl bei den α - als auch bei den β -Produkten recht häufig ein vollständiger Verlust von Exon 3 beobachtet.

Dass mehrere Varianten dieses Exons existieren, es aber auch teilweise ganz fehlen kann, spricht am ehesten dafür, dass dieser Bereich wohl nicht essenziell für die Enzymfunktion ist. Wie bereits von Ohtsubo beschrieben, wurden auch von uns interindividuelle Unterschiede bei der Häufigkeit der verschiedenen Transkripte festgestellt (Ohtsubo et al., 2000). So war beispielsweise bei dem Probanden V2 die β 2-mRNA die häufigste Form, obwohl diese ansonsten nur selten beobachtet wurde. Dabei bleibt offen, ob es sich bei den beobachteten Phänomenen um Zufälle handelt, oder ob bisher unbekannte Faktoren das Spleißen je nach zellulären Anforderungen in eine bestimmte Richtung lenken können.

8.4.4 Konsequenzen der neuen Spleißvarianten auf Proteinebene

Neben den alternativen Spleißformen des Exons 3 wurden von uns 16 einzelne Spleißvarianten gefunden, die andere Exons betreffen oder bei denen das ganze Exon 3 oder Teile davon deletiert wurden. Davon waren lediglich zwei vorbeschrieben (Exon 1 β +237 bp, Yamaguchi et al., 2002; 150 bp-Insert aus Intron 1, Ohtsubo et al., 2000). Da auch Kombinationen dieser Spleißvarianten beobachtet wurden, konnten insgesamt 21 neue mRNA-Varianten erstmals nachgewiesen werden. Entscheidend ist, welche der Spleißvarianten zur Bildung möglicherweise funktionsfähiger Enzyme führen könnten und bei welchen keine Bildung sinnvoller Proteine erwartet werden kann. Die Übersetzung der Basensequenz der verschiedenen mRNA-Spleißformen in die entsprechende Aminosäuresequenz ergab, dass die Mehrzahl der Spleißvarianten für einen Rasterschub sorgt und in Bildung eines veränderten oder verkürzten, wohl zumeist funktionslosen Proteins resultiert. Nur bei wenigen Varianten kommt es zu keinem Rasterschub, sodass dem Protein nur die den verlorengegangenen Basen entsprechenden Aminosäuren fehlen. Aus diesem Grund gehen wir davon aus, dass es sich im Gegensatz zum alternativen Spleißen des Exons 3 bei diesen Spleißvarianten am ehesten um wirkliche Spleißfehler handelt. Warum bei der Bildung dieser Varianten nicht die eigentlichen Spleißstellen sondern alternative Stellen mit ähnlicher Basenabfolge genutzt werden, konnte nicht geklärt werden. Ebenfalls unklar bleibt, warum im Falle von *MYH* mit einem Anteil von über 40% so viele Transkripte Fehler aufweisen. Tabelle 37 fasst die Konsequenzen der Varianten auf Proteinebene zusammen. In den nachfolgenden Kapiteln sollen die einzelnen Varianten eingehender diskutiert werden.

Tabelle 37: Konsequenzen der Spleißvarianten auf Proteinebene im Überblick

Die Mehrzahl der Varianten führt zu einem Rasterschub (fs) und anschließendem Abbruch der Aminosäurekette an einem Stopcodon (STOP). Die Varianten traten ohne klare Bevorzugung einer der sechs verschiedenen Exon 3-Formen auf. Bei den α -Transkripten war die Variante 1, bei den β -Formen die Variante 4 am häufigsten vom Fehlspleißen betroffen. Bei beiden zeigte die Variante 3 am seltensten Spleißfehler.

Auffälligkeit	Konsequenz
um 4 bp verkürztes Exon 1*	Veränderung (fs) ab aa 11; aa 14 STOP
um 16 bp verlängertes Exon 1*	Veränderung (fs) ab aa 13; aa 46 STOP
um 237 bp verlängertes Exon 1 $\beta^{\dagger\ddagger}$	enthält 1 ATG; Translation des ansonsten untranslatierten Exons; nach 9 aa STOP ; evt. Translation-Reinitiation am regulären ATG (Exon 2)
141 bp Insert aus Intron 1 †	enthält 3 ATGs in gleichem Leseraster; Translationsstart hier möglich; nach 20 aa STOP
150 bp Insert aus Intron 1 †‡	enthält 2 ATGs in gleichem Leseraster; nach 7 aa STOP
Deletion des Exons 2 †	Deletion 121 bp Startkodon für β -mRNAs in Exon 2 geht verloren Folgen abhängig von Exon 3 Variante: -Transkriptvariante 1: del 39 aa -Transkriptvariante 2: fs, nach 7 aa STOP Bei allen α -Transkripten fs und STOP
Deletion der Exons 2 bis 6*	Deletion von 459 bp; Deletion 153 aa
Deletion des Exons 3 †	Stimmt bis aa 40 mit β 1 überein; aa 42 STOP
56 bp Deletion in Exon 3 †	Deletion von 56 bp in Exon 3; Veränderung (fs) ab aa 60; aa 73 STOP
Deletion der Exons 3 bis 6	Deletion 338 bp; fs mit STOP
Retention des Introns 5*	Retention von 137 bp; Änderung (fs) ab aa 152, aa 167 STOP
Deletion des Exons 5 $^{\#}$	Deletion 74 bp; Veränderung ab aa 127; aa 224 STOP
Deletion der Exons 5 und 6*	Deletion 116 bp; Veränderung (fs) ab aa 127, aa 210 STOP
Deletion des Exons 6 $^{\#}$	Deletion 42 bp; Deletion 14 aa
Transkription der Introns 4+5	Deletion 251 bp; fs mit STOP
Transkription der Introns 5+6	Deletion 220 bp; fs mit STOP

* nur bei der α -Transkriptanalyse identifiziert; † nur bei der β -Transkriptanalyse identifiziert

$^{\#}$ bei beiden gefunden; ‡ vorbeschriebene Variante; (aa)= Aminosäuren; (fs)= frameshift

8.4.4.1 Veränderungen im Bereich von Exon 1 α

Durch Verwendung alternativer 5'-Spleißstellen kann das Exon 1 α um 4 Basenpaare verkürzt oder um 16 Basenpaare verlängert werden (siehe Abb. 29 und 31). Aus Tabelle 38 geht hervor, dass die regulär genutzte Spleißstelle für Exon 1 α (Zeile 2) der typischen Basenabfolge einer 5'-Spleißstelle (Zhang et al., 1998) am ehesten entspricht und somit wohl den günstigsten Kontext aufweist. Die wichtigen Positionen +1, +2 und +5 stimmen jedoch in allen 3 Fällen mit der beim Menschen am häufigsten beobachteten Konsensussequenz (Zhang et al., 1998) überein. Das relativ häufige Auftreten der beiden Spleißvarianten (8x del GTGG; 6x Exon 1 β +16 bp) könnte am ehesten damit erklärt werden, dass die Spleißmaschinerie

teilweise eine der beiden falschen, aber der eigentlichen Spleißstelle sehr ähnlichen, Stellen wählt.

Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass einer der Polymorphismen in Exon 1 durch Zerstörung eines bisher unbekanntes Spleißverstärkers (ISE; *intronic splicing enhancer*) mit Einfluss auf die reguläre Spleißstelle eine Rolle beim Entstehen der Varianten spielt und damit zu einer häufigeren Nutzung der falschen Stellen führt. Da beide Spleißvarianten bei beiden Personen (H177 und V1) vorkamen, müsste der Enhancer bei beiden Personen inaktiviert worden sein. Da Spleißenhancer sehr weit von dem regulierten Exon entfernt liegen können, wäre eine kausative Rolle der bei beiden Probanden gefundenen Intron1-Variante an Position 4728 (AF527839; IVS 1+3430 C>G) denkbar. Bei beiden fehlgespleißten Varianten kommt es zu einem Rasterschub mit Abbruch der Proteinbiosynthese an einem vorzeitigen Stopkodon. Von einer Entstehung funktionsfähiger Enzyme kann also nicht ausgegangen werden.

Tabelle 38: Verschiedene 5'-Spleißstellen des Exons 1 α im Vergleich mit der Konsensussequenz

Abweichungen von der typischen Sequenz sind grau hinterlegt. In der ersten Zeile ist die von Zhang et al., 1998 ermittelte Konsensussequenz wiedergegeben.

	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5
Konsensussequenz	A	G	G	T	A/G	A	G
Exon 1α (normal)	G	G	G	T	A	C	G
Exon 1α del 4bp	C	T	G	T	G	G	G
Exon 1α ins 16bp	C	G	G	T	C	C	G

8.4.4.2 Deletion von 56 Basenpaaren in Exon 3

Bei dieser Variante (siehe Abb. 41) wird innerhalb des Exons 3 abgespleißt. Ein Teil des Exons 3 wird aus der mRNA entfernt und der Rest des Exons 3 wieder eingespleißt. Zum abspleißen wird die bei der Variante 4 des Exons 3 als 3'-Spleißstelle genutzte Basensequenz als 5'-Spleißstelle genutzt.

Tabelle 39: Neu genutzte 5'-Spleißstelle bei der Deletion von 56 bp aus Exon 3

Die bei dieser Spleißvariante genutzte 5'-Spleißstelle ist der von Zhang et al., 1998 ermittelten Konsensussequenz gegenübergestellt. Abweichungen sind grau hinterlegt.

	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5
Konsensussequenz	A	G	G	T	A/G	A	G
Spleißstelle 56 bp del	A	G	A	G	A	C	G

Es überrascht, dass eine Sequenz, die nicht das typische GT sondern ein AG an den außerordentlich wichtigen Stellen +1 und +2 aufweist, im umgebenden Kontext aber die Struktur einer 5'-Spleißstelle zeigt, als solche genutzt werden kann (Tab. 39). Darüber hinaus

fehlt der beim Einspleißen des Restes von Exon 3 als 3'-Spleißstelle verwendeten Sequenz der einer solchen AG-Stelle normalerweise vorangehende Polypyrimidintrakt.

Wenn auch nicht eindeutig geklärt werden kann, wie das Fehlspleißen an der erwähnten Stelle zustande kommt, führt der Verlust der 56 bp zu einem Rasterschub mit anschließender Bildung eines Stopkodons.

8.4.4.3 Verlängerung des Exons 1 β um 237 Basenpaare

Die Keimbahnvariante IVS 1 β +5 G>C (7.4.1) soll die regulär genutzte 5'-Spleißstelle des Exons 1 β inaktivieren (Yamaguchi et al., 2002). Stattdessen soll eine ansonsten nicht verwendete, nahezu identische, 237 bp entfernte Spleißstelle (Tab. 40 Zeile 3) genutzt werden. Diese Aktivierung einer normalerweise nicht genutzten, verborgenen Spleißstelle wird als *cryptic splice site activation* bezeichnet. Passend zu dieser Vorstellung wurde auch in unserer Untersuchung die Spleißvariante mit um 237 bp verlängertem Exon 1 β (Yamaguchi et al., 2002) ausschließlich bei einem Patienten mit der IVS 1 β +5 G>C-Genvariante gefunden.

Tabelle 40: Die 5'-Spleißstellen bei Varianten des Exons 1 β

In der ersten Zeile ist die Konsensussequenz dargestellt. Die normalerweise genutzte Spleißstelle ist in Zeile 2 wiedergegeben. Bei Vorliegen des Polymorphismus IVS 1 β +5 G>C wird diese an Stelle +5 verändert (Zeile 3), sodass hier nicht abgespleißt wird. Stattdessen werden 237 bp zusätzlich eingespleißt und eine alternative Spleißstelle (Zeile 4) genutzt. Abweichungen von der Konsensussequenz sind grau hinterlegt.

	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5
Zhang et al. 1998	A	G	G	T	A/G	A	G
Exon 1β (normal)	G	G	G	T	A	G	G
Exon 1β (IVS 1+5 G>C)	G	G	G	T	A	G	C
Exon 1β + 237bp	T	G	G	T	A	G	G

Bei der Patientin H177 (heterozygot für die IVS 1 β +5 G>C-Variante) wurde in fünf der sechs identifizierten Transkripte mit dem um 237 bp verlängerten Exon 1 β in diesem das Wildtyp-G-Allel der IVS 1 β +5 G>C-Variante gefunden (siehe Abb. 35). Das Fehlspleißen scheint somit auch bei den vom nicht mutierten Allel kopierten Transkripten, aber Vorliegen der Variante auf dem anderen Allel, stattzufinden. Auch wenn die Spleißvariante Exon 1 β +237 bp bisher nur bei Patienten mit dem IVS 1 β +5 G>C-Polymorphismus gefunden wurde, kann das in unseren fehlgespleißten Transkripten gesehene Phänomen nicht allein auf die Existenz des IVS 1 β +5 G>C-Polymorphismus zurückgeführt werden. So müsste dieser über einen bisher unbekanntem Mechanismus das Spleißen der vom nicht mutierten Allel transkribierten Prä-mRNA mitbeeinflussen.

Auch der Einfluss eines anderen Intron-Polymorphismus auf die Wahl der 3'-Spleißstelle dieses Exons über Wechselwirkung mit einem Spleiß-Silencer oder -Enhancer muss als

alternative Ursache für die Spleißvariante in Erwägung gezogen werden. Da diese in unserer Studie nur bei der Patientin H177 nachgewiesen wurde, müsste es sich jedoch um eine exklusiv bei dieser Patientin und nicht bei den Probanden V1 und V2 vorkommende Genvariante handeln. Allerdings wurde keine der Intron 1-Varianten sondern nur die relativ weit entfernte IVS 2+30 A>G-Variante ausschließlich bei dieser Patientin gefunden. Ebenfalls nicht bei unserer Patientin beobachtet wurden die IVS 1+1520 A>G- und IVS 1+3427 G>C-Varianten, die in der Zelllinie, bei der das 237 bp-Insert erstmals auftrat, neben der IVS 1 β +5 G>C-Variante gefunden wurden (Yamaguchi et al., 2002).

Damit können unsere Beobachtungen die bisherigen Vorstellungen zur Entstehung der Spleißvariante (Schädigung der regulären 5'-Spleißstelle durch IVS 1 β +5 G>C-Variante), so plausibel diese auch klingen mögen, nicht unterstützen. Andererseits konnten auch keine eindeutigen Hinweise auf eine Beeinflussung des Spleißens an dieser Stelle durch andere Intronvarianten gefunden werden. Denkbar wäre deshalb auch, dass es sich bei der Spleißform um ein seltenes, aber auch bei Gesunden auftretendes, alternatives Spleißprodukt handelt und der IVS 1 β +5 G>C-Polymorphismus nur zufällig vorlag, ohne die Ursache für das Fehlspleißen zu sein.

Durch die Verlängerung des Exons 1 β um 237 bp (siehe Abb. 35) weist dieses normalerweise untranslatierte Exon nun ein Startkodon auf. Bei Translation von diesem ATG aus folgt aber bereits nach nur 9 Aminosäuren ein Stopkodon. Durch Translationsreinitiation am bei den β -mRNAs regulär genutzten Startkodon in Exon 2 könnte trotz des Fehlspleißens in einem Teil der Fälle zusätzlich das normale Protein gebildet werden. Da die Reinitiation aber deutlich weniger effektiv ist als die normale Translationsinitiation, wird von der fehlerhaften mRNA höchstens 30% der von normaler mRNA translatierten Proteinmenge gebildet (Yamaguchi et al., 2002).

8.4.4.4 Deletionen einzelner und mehrerer Exons (*exon-skipping*)

Es wurden isolierte Deletionen der kompletten Exons 2, 3, 5 und 6 beobachtet. Zudem traten auch kombinierte Verluste der Exons 5 und 6, 2-6 oder 3-6 auf (siehe Abb. 33 und 39). Wodurch diese hier erstmals beschriebenen Spleißvarianten entstehen, ist unklar. So konnte für keine dieser Spleißvarianten eine eindeutige Beziehung zwischen der jeweiligen Häufigkeit und dem Vorliegen einer bestimmten Intronvariante gezeigt werden.

Bei der Translation führt ein Verlust der Exons 3 oder 5 unweigerlich zu Rasterschubmutationen und einem unterschiedlich schnellen Abbruch der Aminosäurenkette. Dagegen führt ein Fehlen des Exons 6 lediglich zu einem um 14 Aminosäuren verkürzten Produkt, welches eine Enzymaktivität besitzen dürfte. Da diese Variante besonders häufig und sowohl bei der Patientin H177 als auch bei den beiden Probanden V1 und V2 beobachtet wurde, lässt darauf schließen, dass es sich bei Exon 6 um ein sogenanntes Kassetten-Exon handelt (*cassette exon*, Ladd und Cooper, 2002). So werden Exons bezeichnet, die im Rahmen des alternativen Spleißens eingespleißt oder auch recht häufig übersprungen werden können. Die resultierende Änderung der Enzymaktivität bei Vorhandensein oder Fehlen dieses Exons ist nicht bekannt.

Bei Deletion des Exons 2 geht das normalerweise bei den β -mRNAs genutzte Startkodon verloren. Diese Variante wurde ausschließlich in β 2-Transkripten gefunden. Hier führt die Nutzung des nächstmöglichen ATGs relativ schnell zu einem Stopkodon. Würde die Deletion des Exons 2 in einem β 1-Transkript auftreten, so könnte ein anderes Startkodon in Exon 3 genutzt werden (siehe Abb. 45). Da dieses im gleichen Leseraster wie das normalerweise benutzte ATG liegt, würde ein Protein entstehen, dem lediglich 39 N-terminale Aminosäuren fehlen. Bei den α -Transkripten würde der Verlust des Exons 2 immer zu einem Rasterschub führen.

Der Verlust der Exons 3 bis 6 sowie 5 und 6 führt zu Rasterschüben und Stopkodons. Dagegen entsteht bei Verlust der Exons 2-6 ein um 153 Aminosäuren verkürztes Protein. Inwiefern dieses enzymatisch aktiv ist, bleibt offen.

8.4.4.5 Einspleißen von Introns oder Teilen von Introns (*intron-retention*)

Auch das Einspleißen der gesamten Introns 4 und 5 sowie 5 und 6 wurde von uns erstmals beobachtet. Beide Spleißvarianten führen bei Translation der jeweiligen mRNAs zu Rasterschüben. Allerdings sind die Varianten nur in β 4-Transkripten aufgetreten, sodass die Aminosäurekette bereits abbricht, bevor die eingespleißten Introns überhaupt translatiert werden können.

Des Weiteren wurde ein Einspleißen von zwei exonartigen Strukturen aus Intron 1 (siehe Abb. 37 und 40), die 141 und 150 bp lang sind, beobachtet. Diese weisen nahezu optimale 3'- und 5'-Spleißstellen auf (Tab. 41). Das 150 bp lange Insert ist bereits vorbeschrieben (Ohtsubo et al., 2000). In beiden Pseudo-Exons finden sich mindestens zwei Startkodons. Allerdings kommt es bei Translation beider Varianten recht schnell zur Entstehung eines Stopkodons.

Tabelle 41: Das 141 bp- und das 150 bp-Insert aus Intron 1 und ihre Spleißstellen

Die 3'- und 5'-Spleißstellen der beiden Pseudo-Exons aus Intron 1 sind mit den Konsensussequenzen (Zhang et al., 1998) verglichen. Abweichungen sind dunkler hinterlegt.

	5'	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	3'	-7	-6	-5	-3	-2	-1
Konsensus-Sequenz:		A	G	G	T	A/G	A	G		C/T	C/T	C/T	C/T	A	G
141 bp Insert:		C	A	G	T	A	A	G		T	T	C	T	A	G
150 bp Insert:		A	G	G	T	A	A	G		T	T	A	C	A	G

8.4.5 Konsequenzen von Intronvarianten und Spleißfehlern

Es wurde untersucht, ob die beobachteten Spleißvarianten bei bestimmten *MYH*-Intronvarianten gehäuft vorkommen und ob sich hieraus Konsequenzen für die Enzymfunktion ableiten lassen. Bei den β -Transkripten, die neben den γ -Formen für die in den Zellkern transportierten Proteine kodieren sollen, wurden bei der vier *MYH*-Intronvarianten aufweisenden Adenom-Patientin H177 ähnlich viele fehlgespleißte Transkripte wie bei den Probanden V1 und V2 gefunden (siehe 7.5.3.3). Der Proband V1 weist ebenfalls vier, teilweise andere Intronpolymorphismen auf, bei dem Probanden V2 wurden keine Intronvarianten identifiziert.

Lediglich bei den α -Transkripten, die jedoch vorrangig für mitochondriale Proteine kodieren sollen und demnach keine Rolle bei der Reparatur chromosomaler DNA spielen sollten, wurden bei der Patientin signifikant mehr (17 gegenüber 8) Spleißvarianten als bei dem Probanden V1 gefunden.

Betrachtet man die einzelnen Spleißvarianten, so wurde lediglich das um 237 bp verlängerte Exon 1 β und das Einspleißen des 141 bp langen Pseudo-Exons aus Intron 1 ausschließlich bei der Patientin H177 gefunden. Bisher wurde davon ausgegangen, dass das 237 bp-Insert durch den IVS 1 β +5 G>C-Polymorphismus verursacht wird (Yamaguchi et al., 2002). Auch unsere Patientin H177 ist heterozygot für diese Variante. Allerdings stellen unsere Ergebnisse mit einem fehlenden 1 β +5 G>C-Polymorphismus in den fehlgespleißten Transkripten eine Verursachung der Spleißvariante durch diesen Polymorphismus eher in Frage (siehe auch

8.4.4.3). Ansonsten ließ sich weder im Falle der α - noch der β -Transkripte eine klare Häufung einer einzelnen Spleißvariante bei einem bestimmten Intronpolymorphismus erkennen. Vielmehr scheint das häufige Fehlspleißen, das bei allen drei untersuchten Personen zu beobachten war, typisch für *MYH*-Transkripte zu sein und nicht nur bei Vorliegen bestimmter Intronvarianten aufzutreten. Ob einzelne Genvarianten dennoch das Entstehen bestimmter Spleißvarianten fördern, bleibt unklar.

Obwohl bei der Patientin H177 eine bisher in der Literatur nicht beschriebene Häufung von heterozygoten *MYH*-Genvarianten unbekannter Bedeutung gefunden wurde (siehe 7.5.1), ließ sich in dieser Arbeit kein kausaler Zusammenhang zwischen diesen Genvarianten und der klinisch beobachteten Polyposis nachweisen. Es waren nicht mehr fehlgespleißte für die *MYH*-Kernform kodierende β -Transkripte als bei den klinisch unauffälligen Probanden V1 und V2 nachweisbar. Auch wurden insgesamt (α - und β -Transkripte zusammen) bei der Polyposispatientin nicht signifikant mehr Spleißvarianten als bei den gesunden Probanden gefunden.

Bei der Patientin H177 wurde auch keine sicher pathogene Mutation in den Exons 1-14 beobachtet, sondern lediglich der Q324H-Polymorphismus, der jedoch nur einen geringfügigen Funktionsabfall hervorrufen soll (siehe 8.2.3.1; Shinmura et al., 2000). Bei einem Phänotyp, der bezüglich Erkrankungsalter und Adenomzahl weitgehend dem des Patienten H022 (jeweils heterozygot für Y165C und G382D) entspricht, kann vermutet werden, dass die Kombination der verschiedenen *MYH*-Genvarianten über einen noch nicht erfassten Mechanismus eine Funktionseinschränkung der *MYH*-Glykosylase verursachen könnte. Ebenfalls denkbar wäre, dass auch die von den α -mRNAs translatierten, vorrangig mitochondrial erwarteten Enzyme eine wichtige Rolle bei der Reparatur nukleärer Basenläsionen haben (Ohtsubo et al., 2000). Das häufigere Fehlspleißen dieser Transkripte bei der Patientin H177 könnte somit über eine Reduktion funktionstüchtiger Enzyme Mutationen in der nukleären DNA bedingen und zu kolorektalen Adenomen führen.

8.5 *MYH*-Mutationen bei Patienten mit CED

Dass die gängigen *MYH*-Varianten Y165C und G382D in unserer Untersuchung ähnlich häufig bei Patienten mit CED wie bei gesunden Vergleichspersonen vorkamen (7.1.3), spricht gegen eine mögliche Häufung von *MYH*-Mutationen bei CED (Baudhuin et al., 2005). Allerdings könnte unserer Ansicht nach das Vorliegen einer monoallelischen pathogenen *MYH*-Mutation bei CED das Risiko für die Entstehung eines kolitisassoziierten Karzinoms erhöhen.

Patienten mit CED weisen erhöhte 8-oxoG-Spiegel in Darmzellen auf (3.2.4.2). Durch das bei Vorliegen einer aktiven Entzündung vermehrt gebildete NO wird aber auch über eine Inhibition von OGG1 die Entfernung der defekten Base aus der DNA eingeschränkt. Diese Konstellation wird als bedeutender Faktor bei der Karzinogenese in chronisch entzündetem Gewebe angesehen (Jaiswal et al., 2001). Wird nun auch noch die MYH-Funktion durch eine monoallelische Mutation eingeschränkt, so könnte man vermuten, dass dessen Restfunktion nicht ausreicht, um die verminderte OGG1-Aktivität bei gleichzeitig erhöhtem oxidativem Stress zu kompensieren. Logische Konsequenz wäre das häufigere Entstehen von G:C→T:A-Mutationen sowie ein erhöhtes Neoplasierisiko bei Patienten mit langfristig aktiver CED und monoallelischer *MYH*-Mutation (Abb. 46). Bei den beiden CED-Patientinnen H091 und H401 mit monoallelischer *MYH*-Mutation wurden bisher allerdings noch keine Neoplasien identifiziert. Allerdings wurden bei beiden Patientinnen mehrfach entzündete Darmabschnitte reseziert, sodass bei Patientin H401 seit Jahren keine Entzündungsaktivität mehr besteht.

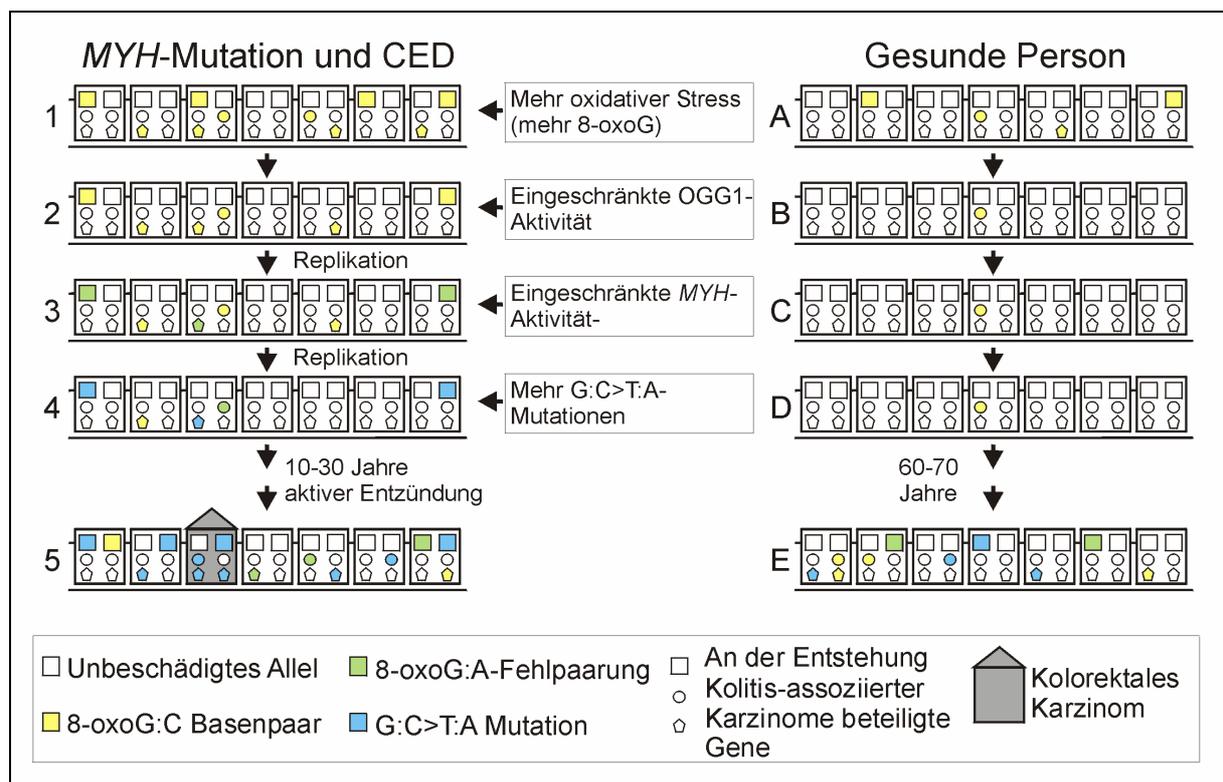


Abbildung 46: Theorie zur Entstehung von Neoplasien bei CED und monoallelischer *MYH*-Mutation

Dargestellt sind 7 Stammzellen im Zeitverlauf. Rechts wird von einem *MYH*-Wildtyp, links vom Vorliegen einer monoallelischen pathogenen *MYH*-Mutation ausgegangen. Durch erhöhten oxidativen Stress bei CED entstehen im Vergleich zu gesunden Personen vermehrt 8-oxoG-Läsionen (1). Zusätzlich kommt es zu einer Verminderung der OGG1 Aktivität (2), sodass weniger beschädigte Basen entfernt werden und mehr 8-oxoG:A-Fehlpaarungen entstehen. Ist dazu noch die MYH-Aktivität durch eine monoallelische Mutation vermindert (3 links), so häufen sich im Zuge mehrerer Replikationszyklen immer mehr G:C→T:A-Mutationen im Genom und somit auch den darmkrebsverursachenden Genen an (4). Weist eine Zelle das zur Karzinomentstehung benötigte Mutationsmuster auf, entsteht ein kolitisassoziertes Karzinom (5). Bei gesunden Personen entstehen dagegen weniger Basenschäden, die zusätzlich wegen nicht eingeschränkter OGG1- und MYH-Aktivität auch effektiver repariert werden können (A-E).

8.6 MYH und hyperplastische Polypen

Hyperplastische Polypen haben in der asymptomatischen Bevölkerung eine Prävalenz von circa 8,6-12,5% und waren auch in der von uns untersuchten Population gesunder Probanden ähnlich häufig (Rex et al., 1991; Lieberman et al., 2003). Auch zwei Patienten mit monoallelischer *MYH*-Mutation (H308, H446) wiesen zwei beziehungsweise drei hyperplastische Polypen auf. In einer neueren Untersuchung wurden bei einem Patienten mit homozygoter *MYH*-Mutation neben 40 Adenomen auch 27 hyperplastische Polypen identifiziert und daraufhin eine Verbindung zwischen *MYH* und hyperplastischen Polypen vermutet (Chow et al., 2006). Auch der compound heterozygote Patient H503 hatte neben seinen zahlreichen Adenomen mindestens vier hyperplastische Polypen. Jedoch können hyperplastische Polypen auch generell häufig gemeinsam mit Adenomen vorliegen (Huang et al. 2004) oder als Folge einer Polypenabtragung auftreten.

Obwohl hyperplastische Polypen über andere Kaskaden als Adenome entstehen (Huang et al., 2004), ist mit *K-ras* häufig ein Gen mutiert (Otori et al., 1997; Chan et al., 2003), das auch bei Adenomen von MAP-Patienten häufig Mutationen aufweist. In einer aktuellen Arbeit konnte eine Häufung von G:C→T:A Transversionen in hyperplastischen Polypen von Patienten mit biallelischen *MYH*-Varianten nachgewiesen werden (Boparai et al., 2008). Somit scheint ein kausaler Zusammenhang zwischen *MYH*-Defizienz und der Ausbildung hyperplastischer Polypen zu bestehen.

8.7 Diagnostik und Therapie von Patienten mit MAP

8.7.1 Wer sollte genetisch getestet werden?

Die Beobachtungen mehrerer Forschungsgruppen, wie auch die Ergebnisse unserer Studie, legen nahe, dass das Alter eines Patienten in Verbindung mit der Zahl der gefundenen Adenome die besten Hinweise auf das Vorliegen einer MAP mit biallelischer *MYH*-Mutation gibt (Wang et al., 2004; Nielsen et al., 2005; Aretz et al., 2006). Daher sollte bei Patienten mit über 15 Adenomen, die in einem Alter von über 30 Jahren diagnostiziert wurden, und die kein autosomal dominantes Vererbungsmuster der Polyposis aufweisen, zuerst nach Mutationen im *MYH*-Gen gefahndet werden. Bei jüngeren Patienten oder bei Vorliegen von über 200 Adenomen sollte zunächst nach Keimbahnmutationen im *APC*-Gen gesucht werden.

Während bisher weitgehend versucht wurde, die MAP gegenüber der *APC*-positiven FAP abzugrenzen, wird immer deutlicher, dass bei biallelischer *MYH*-Inaktivierung auftretende Phänotypen, die sich nicht immer sofort als MAP sondern auch als früh auftretendes kolorektales Karzinom ohne begleitende Polyposis zeigen können (Farrington et al., 2006), auch gegenüber dem Lynch-Syndrom abgegrenzt werden müssen. So konnten HNPCC-

typische Charakteristika wie Diagnose eines kolorektalen Karzinoms mit durchschnittlich 45 Jahren, nur wenige begleitende Adenome, höherer Dysplasiegrad und schnellerer Progress der Adenome zum Karzinom sowie vorrangig rechtsseitige Lokalisation der Neoplasien im Kolon (Jo und Chung, 2005; Strate und Syngal, 2005) auch bei unserem compound heterozygoten Patienten H503 beobachtet werden. Bis zum Auftreten multipler Adenome ab dem Jahr 2000 zeigte der Patient, abgesehen vom Fehlen einer HNPCC-typischen Familienanamnese, ein klinisches Bild, das gut mit einem Defekt in einem Mismatch-Reparaturgen vereinbar wäre. Die wichtigsten klinischen Unterscheidungskriterien zwischen dem Lynch-Syndrom und dem früh auftretenden MYH-assoziierten kolorektalen Karzinom ohne begleitende Polyposis sind daher die Familienanamnese und das Fehlen der typischen extrakolonischen Tumor-Manifestationen. Während die kolorektalen Adenome und Karzinome beim Lynch-Syndrom eine Mikrosatelliteninstabilität aufweisen, sind MYH-assoziierte Adenome und Karzinome in der Regel mikrosatellitenstabil (Lipton et al. 2003).

Klinisches Hauptziel sollte es sein, biallelische Mutationsträger frühzeitig in prognostisch günstigeren Stadien zu identifizieren, bevor hunderte von Adenomen und mehrere kolorektale Karzinome vorliegen. Deshalb sollte in Zukunft überprüft werden, ob relativ junge Patienten (30-55 Jahre) mit KRK mit oder ohne einzelne begleitende Adenome, aber ohne Anzeichen für eine autosomal dominante Vererbung, in größerem Umfang auf *MYH*-Mutationen gescreent werden sollten. Deren Prognose könnte dann durch ein speziell auf MAP abgestimmtes Vorgehen mit besonders kurzen Nachsorgeintervallen oder radikaloperativen Maßnahmen wie der totalen Kolektomie deutlich verbessert werden. Während in einigen Arbeiten Patienten mit früh auftretendem MYH-assoziiertem Karzinom identifiziert wurden (Wang et al., 2004; Croitoru et al. 2004; Fleischmann et al., 2004; Eliason et al., 2005; Farrington et al., 2006), kommen andere Autoren zu dem Schluss, dass Träger biallelischer *MYH*-Mutationen kaum eine Rolle unter jungen Patienten mit KRK ohne begleitende Polyposis spielen (Görgens et al. 2006).

Aufgrund der Allelfrequenz von *MYH*-Mutationen besteht ein Risiko von 2-3%, dass ein MAP-Patient Kinder mit einem für *MYH*-Mutationen heterozygoten Partner hat (Sieber et al., 2003). In einer solchen Konstellation hätten die Kinder statistisch ein 50%iges Risiko auch biallelische *MYH*-Mutationen zu tragen. Ob der Partner eines MAP-Patienten deshalb zum Wohle der Kinder getestet werden sollte, ist ethisch fraglich (Sieber et al., 2003; Wang et al. 2004). Unstrittig ist dagegen, dass Geschwistern eines Patienten mit nachgewiesener biallelischer *MYH*-Mutation eine genetische Beratung und anschließend eine *MYH*-Mutationsanalyse angeboten werden sollte, da bei zwei heterozygoten Eltern statistisch 25% der Geschwister auch biallelische *MYH*-Mutationen aufweisen müssten. Ein sinnvolles

Vorgehen zur genetischen Testung bei Patienten mit multiplen kolorektalen Adenomen oder jungem Alter bei Diagnose eines solitären kolorektalen Karzinoms kann entsprechend dem jeweils vorliegenden klinischen Bild aus dem in Abbildung 47 dargestellten Algorithmus abgeleitet werden.

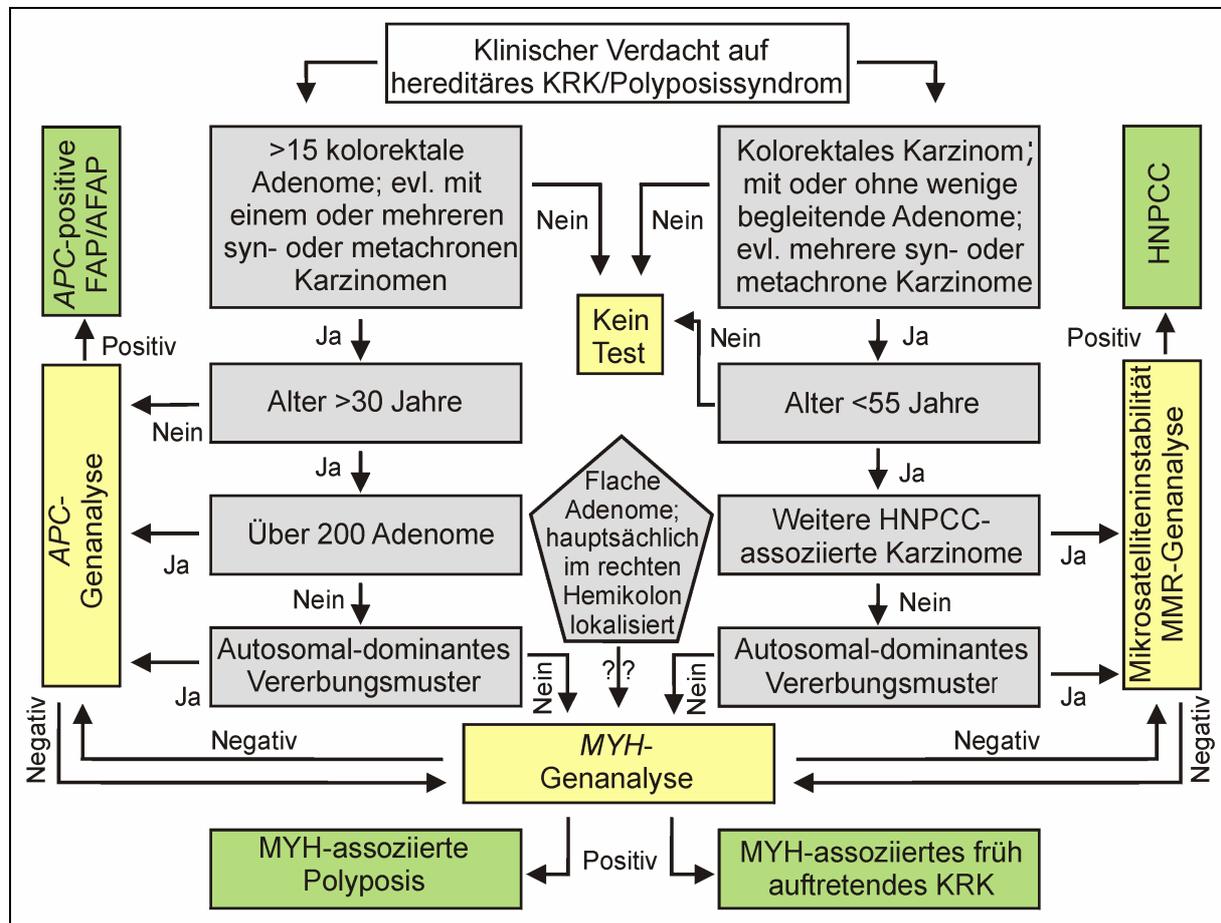


Abbildung 47: Algorithmus zur Genanalyse bei Verdacht auf hereditäres KRK oder Polyposissyndrom

8.7.2 Mit welchem Verfahren sollte gescreent werden?

Aufgrund der Tatsache, dass die Y165C- und G382D-Varianten auch in Deutschland mit weitem Abstand am häufigsten vorkommen, empfiehlt es sich zunächst die Exons 7 und 13 zu untersuchen. Erst bei negativem Ergebnis oder Identifikation einer monoallelischen Mutation sollte die zeit- und kostenintensivere Betrachtung weiterer Bereiche des Gens erfolgen (Venesio et al., 2004; Aretz et al., 2006). Bevor das gesamte Gen sequenziert wird, könnten in einem zwischengeschalteten Schritt die Exons 12-14, in denen neben den beiden Hotspots die Mehrzahl der Mutationen auftreten (siehe Tab. 30), als ein Fragment amplifiziert und anschließend analysiert werden.

Mit welchem Verfahren zunächst nach den beiden Hotspotmutationen gefahndet wird, dürfte von untergeordneter Bedeutung sein. So wurden bereits zahlreiche Verfahren wie

fluorescence single-strand conformation polymorphism analysis (Sieber et al., 2003), *pyrosequencing* (Wang et al., 2004), *denaturing high-performance liquid chromatography* (Croitoru et al., 2004) oder das Sequenzieren von PCR-Produkten (Gismondi et al., 2004) angewandt. Auch der von uns verwendete Restriktionsverdau, der von verschiedenen Arbeitsgruppen in ähnlicher Form bereits zur Bestätigung der Ergebnisse anderer Verfahren benutzt wurde (Al-Tassan et al., 2002; Isidro et al. 2004), könnte als relativ billiges und schnelles, aber dennoch zuverlässiges, Verfahren routinemäßig eingesetzt werden. Sein Nachteil liegt darin, dass die sichere Beurteilung der Ergebnisse je nach Signalstärke einer gewissen Erfahrung im Umgang mit der Technik bedarf. Die Analyse größerer Genabschnitte sollte am sichersten mittels Sequenzierung erfolgen.

8.7.3 Welche Therapie und Nachsorge sollte durchgeführt werden?

Bei relativ mildem Verlauf einer MAP wird gegenwärtig ein konservatives Vorgehen mit engmaschigen koloskopischen Polypektomien als vertretbare und suffiziente therapeutische Maßnahme angesehen (Wang et al., 2004; Fornasarig et al., 2006). Obgleich bisher keine Leitlinien ein bestimmtes Vorgehen empfehlen, sprechen unsere Erfahrungen sowie diejenigen einer italienischen Klinik (Fornasarig et al., 2006) für Koloskopieintervalle von circa einem Jahr. Treten trotz dieses Vorgehens aufgrund des scheinbar beschleunigten Adenomprogresses schwerere Dysplasien oder Karzinome auf, oder ist aufgrund sehr großer Polypenzahlen eine vollständige Entfernung nicht mehr möglich, wäre auch eine prophylaktische Kolektomie zu diskutieren (Sieber et al., 2003; Wang et al., 2004; Leite et al., 2005). Langzeitergebnisse oder Kosten-Nutzen-Relationen liegen entgegen dem Lynch-Syndrom bei der MAP noch nicht vor. Wegen einem möglichen Auftreten von Duodenaladenomen oder Magenfundusdrüsen-Polypen bei MAP sollten bei Diagnosestellung und im Intervall Ösophagogastroduodenoskopien durchgeführt werden (Nielsen et al., 2005; Aretz et al., 2006).

Solange ein erhöhtes Risiko für monoallelische Mutationsträger nicht ausgeschlossen ist, sollten Nachkommen oder heterozygote Geschwister von MAP-Patienten eine Basiskoloskopie erhalten. Diese sollte bei negativem Ergebnis alle 3-5 Jahre wiederholt werden (Wang et al., 2004). In Abbildung 48 ist zusammengefasst, welches klinische Vorgehen bei Patienten mit nachgewiesenen *MYH*-Varianten und bei deren nicht genetisch getesteten Nachkommen oder Geschwistern empfohlen werden könnte.

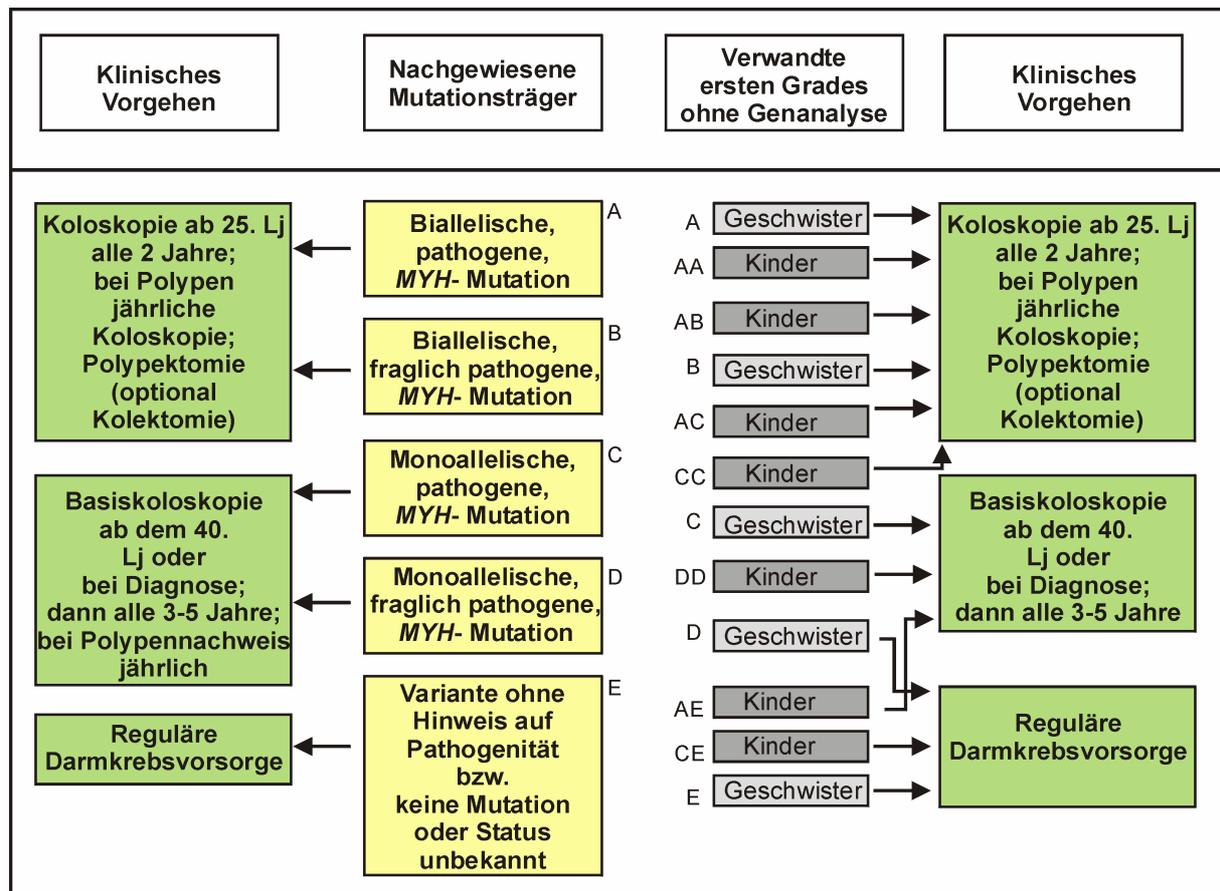


Abbildung 48: Klinisches Vorgehen bei Patienten mit sicherer *MYH*-Genvariante und deren Angehörigen
 Auf der linken Seite ist das empfohlene Vorgehen bei Patienten mit nachgewiesener *MYH*-Variante dargestellt (modifiziert nach Wang et al., 2004; Fornasarig et al., 2006; Aretz et al., 2006). Die Empfehlungen für ein risikoadaptiertes Vorgehen bei Nachkommen (wichtige Konstellationen angegeben) und Geschwistern von Patienten mit gesicherter Genvariante, selbst aber unbekanntem Mutationsstatus, sind im rechten Teil der Abbildung wiedergegeben. Bei Kindern ist durch Buchstabenkombination angegeben welchen Mutationsstatus die Eltern haben. Bei Geschwistern ist durch einen Buchstaben der Mutationsstatus des untersuchten Geschwisters angegeben. Ist bei einer Person eine biallelische Mutation wahrscheinlich, so sollte besser eine *MYH*-Genanalyse und Vorgehen entsprechend dem linken Teil der Abbildung erfolgen.

Bisher zeigte eine Einnahme von antioxidativen Substanzen wie der Vitamine A, C und E keine Wirkung auf die Menge des im Urin ausgeschiedenen 8-oxoG. In einem Fall konnte die Zahl neu entstehender Adenome aber durch Einnahme von NSAIDs gesenkt werden (Fornasarig et al., 2006). Ob durch eine Therapie mit Celecoxib (2 x 400 mg/Tag) wie bei *APC*-positiver FAP (Steinbach et al., 2000) eine signifikante Reduktion der Zahl pro Zeiteinheit neu entstehender Adenome erreicht werden kann, sollte in zukünftigen Studien erörtert werden.

Die gültigen Empfehlungen zur Dysplasieüberwachung bei Patienten mit CED (Raithel et al., 2001) sollten auch bei Patienten mit CED und *MYH*-Mutation ausreichend sein. Eventuell sollte allerdings bis zum Ausschluss eines früheren Auftretens von Dysplasien bei CED und *MYH*-Mutation ein Beginn bereits nach fünf statt wie sonst empfohlen nach acht bis zehn Erkrankungsjahren erwogen werden.

9 Schlussfolgerungen, kritische Wertung und Ausblick

Träger pathogener biallelischer *MYH*-Keimbahnmutation konnten im untersuchten Gesamtkollektiv mit einer Häufigkeit von 0,3% nachgewiesen werden. Betrachtet man nur die Patienten mit über 15 Kolonadenomen, so erhöht sich diese Rate auf 12,5%. Die MAP sollte somit auch in der täglichen gastroenterologischen Praxis in die differentialdiagnostischen Überlegungen miteinbezogen werden. Bei einer Polyposis mit mehr als 10-15 kolorektalen Adenomen ab einem Alter von über 30 Jahren sollte an eine MAP gedacht und eine *MYH*-Mutationsdiagnostik initiiert werden. Da in unserem Kollektiv neben den beiden *MYH*-Hotspotmutationen Y165C und G382D keine weiteren sicher pathogenen Mutationen nachgewiesen werden konnten, kann eine genetische Diagnostik von den Exons 7 und 13 aus begonnen werden und erst bei fehlendem oder monoallelischem Mutationsnachweis auf weitere Exons ausgeweitet werden.

Der Krankheitsverlauf des von uns identifizierten MAP-Patienten konnte über mehr als 14 Jahre dokumentiert werden. Damit ließ sich dessen Krankheitsverlauf von einem einzelnen Sigmakarzinom auf dem Boden eines tubulovillösen Adenoms an über einen derart langen Zeitraum bis hin zur Ausbildung eines AFAP- und schließlich FAP-Phänotyps beobachten. Durch Aufarbeitung seines Krankheitsverlaufs konnten klinisch wertvolle Informationen zum bisher nicht genau bekannten Longitudinalverlauf der MAP gewonnen werden.

So können wir aus unseren Beobachtungen schlussfolgern, dass die bisher bei Patienten mit biallelischer *MYH*-Mutation beobachteten Phänotypen (selten früh auftretendes KRK, einzelne Adenome mit oder ohne begleitendes KRK, am häufigsten AFAP und etwas seltener FAP) im Laufe der Erkrankung aufeinander folgen und ineinander übergehen. Damit dürfte es sich bei den verschiedenen Erscheinungsbildern nicht um grundsätzlich unterschiedliche Verläufe der MAP sondern lediglich um eine je nach Beobachtungszeitpunkt unterschiedlich weit fortgeschrittene Erkrankung handeln. Durch großzügigere Indikationsstellung zur *MYH*-Gendiagnostik bei jungen Patienten mit kolorektalen Adenomen oder Karzinomen ohne Hinweis auf dominante Vererbung könnten zunehmend Frühstadien der MAP diagnostiziert werden. Durch engmaschige endoskopische Verlaufskontrollen könnte die Prognose der betroffenen Patienten gegebenenfalls deutlich verbessert werden und die klinische Befundentwicklung möglichst genau dokumentiert werden. Mithilfe der hierbei erhobenen Daten könnten dann auch verlässliche Empfehlungen zu koloskopischen Kontrollintervallen erarbeitet werden. Des Weiteren könnte evaluiert werden in welchen Situationen eine Kolektomie dem endoskopischen Vorgehen überlegen ist. Ob bezüglich des Ansprechens auf eine Chemotherapie Unterschiede zwischen sporadischen und im Rahmen einer MAP entstandener KRK bestehen, bleibt abzuwarten. Insbesondere könnte hier das häufigere

Vorkommen von *K-ras* Mutationen in Hinblick auf eine Therapie mit EGFR-Antikörpern den Verlust einer therapeutischen Alternative in einem Teil der Fälle bedeuten.

In zukünftigen Arbeiten sollte durch stärkere Fokussierung auf endoskopische Aspekte geklärt werden, ob eine Akzentuierung der Adenome im rechten Hemikolon, begleitende hyperplastische Polypen und ein vorrangig flaches Wachstumsmuster der Adenome wichtige Hinweise auf Vorliegen einer MAP liefern können.

Bei Verdacht auf beschleunigten Adenomprogress bei MAP sollten in Zukunft die histologischen Kriterien der Adenome einer größeren Zahl von MAP-Patienten mit denjenigen von sporadischen Adenomen verglichen werden. Darüber hinaus könnte in Adenomen von MAP-Patienten und sporadischen Adenomen gleicher Größe nach somatischen G:C→T:A-Mutationen in Genen, die zur malignen Transformation eines Adenoms führen sollen, gesucht werden. Ein deutlich häufigeres Vorkommen in MAP-Adenomen könnte dann für einen *MYH*-bedingten, beschleunigten Adenomprogress zum Karzinom sprechen.

Monoallelische *MYH*-Mutationen konnten im untersuchten Gesamtkollektiv und bei Patienten mit kolorektalen Adenomen oder Karzinomen bei 1,7% beziehungsweise 1,5% der Patienten gefunden werden. Ein durch Metaanalyse mehrerer kleinerer Studien ermitteltes, signifikant erhöhtes Neoplasierisiko für Träger monoallelischer *MYH*-Mutationen, konnte durch unsere Arbeit nicht bestätigt werden. Aufgrund des Ausfalls oder der Funktionsminderung nur eines Teils der *MYH*-Glykosylasen bei monoallelischer Mutation sind bei diesen Patienten unserer Vorstellung nach in der Regel erst ab dem 60. Lebensjahr *MYH*-assoziierte kolorektale Adenome zu erwarten. Drei von vier in unserer Untersuchung identifizierten Patienten mit monoallelischen *MYH*-Mutationen, aber unauffälligem Koloskopiebefund, waren jedoch jünger als 60 Jahre. In zukünftigen Untersuchungen müssten durch getrennte Analyse verschiedener Altersgruppen verlässlichere Daten zum Adenomrisiko bei monoallelischer Mutation als in bisherigen Studien erhoben werden können. Inwiefern Adenome oder Karzinome bei Patienten mit monoallelischer *MYH*-Mutation wirklich Folge einer verminderten *MYH*-Funktion sind, könnte durch Nachweis von somatischen G:C→T:A-Mutationen in den an der kolorektalen Karzinogenese beteiligten Genen geklärt werden.

Gegenwärtig ist noch unklar wie groß der durch *MYH*-Mutationen verursachte oder zumindest mitverursachte Anteil der kolorektalen Karzinome wirklich ist. Insgesamt scheint die Bedeutung bei nicht im Rahmen einer Polyposis auftretenden und somit sporadisch erscheinenden Karzinomen unterschätzt zu werden.

Neben den bekannten Intronvarianten IVS 1+5 G>C, IVS 2+30 A>G und IVS 6+35 G>A konnten auch drei neue Intronvarianten (IVS 1α+314 G>C, IVS 1β+2900 T>G und IVS

1 β +3430 C>G) identifiziert werden. Durch Analyse der MYH- α - und β -mRNAs konnten 21 neue Spleißvarianten gefunden werden. Bei Translation dieser mRNAs kommt es in der Mehrzahl der Fälle zur Ausbildung eines Stopkodons, Abbruch der Aminosäurenkette und Entstehung wahrscheinlich nicht funktionstüchtiger Proteine. Man kann daraus schließen, dass es sich bei diesen Spleißvarianten um fehlgespleißte Transkripte handelt. Die Ursache dieses Fehlspleißens ist noch nicht geklärt. Das Entstehen einer dieser Spleißvarianten durch eine bestimmte Intronvariante konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Um bessere Informationen zum MYH-Prä-mRNA-Spleißen und der Verursachung von Spleißfehlern durch Intronvarianten zu erhalten, sollten in Zukunft die Transkripte von größeren Patientengruppen untersucht werden. Dabei wäre es sinnvoll die mRNAs von Patienten, die jeweils nur einen einzigen Intronpolymorphismus aufweisen, mit denjenigen von Patienten ohne Intronvarianten zu vergleichen.

Unterschiedliche DNA-Glykosylaseaktivitäten der durch alternatives Spleißen entstehenden Proteine könnten durch Expression der mRNA-Varianten in *E.coli* oder Hefepilzen und Bestimmung der Reparaturaktivität in einem Adenin-Glykosylase-Aktivitäts-Assay (Shinmura et al., 2000; Chmiel et al., 2001) festgestellt werden. Ob ein Teil der durch alternatives Spleißen entstehenden Proteine im Rahmen bestimmter zellulärer Kontexte Vorteile gegenüber normal gespleißten Formen besitzt, ist im Moment noch unklar. Inwiefern das Auftreten alternativ gespleißter Transkripte Krankheitswert besitzt und die Entstehung kolorektaler Adenome oder Karzinome verursachen kann, muss in zukünftigen Arbeiten durch Fokussierung auf die bisher kaum untersuchten Spleißvarianten geklärt werden.

10 Literaturverzeichnis

1. Aaltonen LA, Saalovara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P (1998): Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N. Engl. J. Med.* 21: 1481-1487
2. Aceto G, Curia MC, Veschi S, De Lellis L, Mammarella S, Catalano T, Stuppia L, Palka G, Valanzano R, Tonelli F, Casale V, Stigliano V, Cetta F, Battista P, Mariani-Costantini R, Cama A (2005): Mutations of APC and MYH in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli. *Hum. Mutat.* 26: 394
3. Alhopuro P, Parker AR, Lehtonen R, Enholm S, Järvinen H, Mecklin JP, Karhu A, Eshleman JR, Aaltonen LA (2005): A novel functional deficient MYH variant in individuals with colorectal adenomatous polyposis. *Hum. Mutat.* 26: 393
4. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston A, Williams GT, Hodgkes AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP (2002): Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* 30: 227-232
5. Al-Tassan N, Eisen T, Maynard J, Bridle H, Shah B, Fleischmann C, Sampson JR, Cheadle JP, Houlston RS (2004): Inherited variants in MYH are unlike to contribute the risk of lung carcinoma. *Hum. Genet.* 114: 207-210
6. Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, Siberg K, Vogel M, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Propping P, Friedl W (2006): MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int. J. Cancer* 119: 807-814
7. Askling J, Dickman PW, Karlen P, Broström O, Lapidus A, Löfberg R, Ekblom A (2001): Family History as a Risk Factor for Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 120: 1356-1362
8. Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chang CG, Moliaro-Clark A, Baretton GB, Loehrs U, Waldman FM (2002): The APC/β-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. *Cancer* 94: 1421-1427
9. Babbs CF (1990): Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 8: 191-200
10. Baglioni S, Melean G, Gensini F, Santucci M, Statizzi M, Papi L, Genuardi M (2005): A kindred with MYH-associated polyposis and pilomatricomas. *Am. J. Med. Genet.* 134: 212-214
11. Baltes S, Bonner E, Gorges D, Fuchs R, Müller R, Stegmaier C, Teis R, Winkelsträter S, Ziegler H (2003): Krebs im Saarland 1998-2000 Inzidenz, Mortalität und Prävalenz an bösartigen Neubildungen, Epidemiologisches Krebsregister Saarland, Saarbrücken 2003, 17-34
12. Barnetson RA, Devlin L, Miller J, Farrington SM, Slater S, Drake AC, Campbell H, Dunlop MG, Porteous ME (2007): Germline mutation prevalence in the base excision repair gene *MYH*, in patients with endometrial cancer. *Clin. Genet.* 72: 551-555
13. Baudhuin LM, Roberts LR, Enders FTB, Swanson RL, Mettler TA, Aderca I, Stadheim LM, Highsmith WE (2005): MYH Y165C and G382D mutations in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132: 159-162
14. Beiner ME, Zhang WW, Zhang S, Gallinger S, Sun P, Narod SA (2008): Mutations of the *MYH* gene do not substantially contribute to the risk of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* (online erschienen am 04.05.2008)
15. Benzi G, Pastoris O, Marzatico F, Villa RF, Dagani F, Curti D (1992): The mitochondrial electron-transfer alteration as a factor involved in the brain aging. *Neurobiol. Aging* 13: 361-368
16. Berget SM, Moore C, Sharp PA (1977): Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3171-3175
17. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A (2001): Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: A population-based study. *Cancer* 91: 854-862

18. Beroud C, Soussi T (1996) APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 24: 121-124
19. Bertz J, Hentschel S, Hundsdörfer G, Kaatsch P, Katalinic A, Lehnert M, Schön D, Ziegler H (2004): Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken 2004, 28-32
20. Black DL (2003): Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Bioch.* 72: 291-336
21. Boldogh I, Milligan D, Lee MS, Bassett H, Lloyd RS, McCulloch AK (2001): hMYH cell cycle dependent expression, subcellular localization, and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs. *Nucleic Acids Res.* 29: 2802-2809
22. Boparai KS, Dekker S, van Eeden S, Polak MM, Bertelsman JFWM, Mathus Vliegen EMH, Keller JJ, van Noesel CJM (2008) Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated Polyposis. *Gastroenterology* 135: 2014-2018
23. Bouguen G, Manfredi S, Blayau M, Dugast C, Buecher B, Bonneau D, Siproudhis L, David V, Bretagne JF (2006): Colorectal Adenomatous Polyposis Associated with MYH Mutations: Genotype and Phenotype Characteristics. *Dis. Colon Rectum* 50: 1612-1617
24. Brieba LG, Eichman BF, Kokoska RJ, Double S, Kunkel TA, Ellenberger T (2004): Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase. *EMBO J.* 23: 3452-3461
25. Bulow S, Faurschou Nielsen T, Bulow C, Bisgaard ML, Karlsen L, Moesgaard F (1996): The incidence rate of familial adenomatous polyposis. Results from the Danish Polyposis Register. *Int. J. Colorectal Dis.* 11: 88-91
26. Burge CB, Tuschl T, Sharp PA (1999): Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In: Gestland RF (ed) *The RNA World*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 525-560
27. Burmer GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Crispin DA, Brentnall TA, Kolli VR, Stevens AC, Rubin CE (1992): Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of p53 allele. *Gastroenterology* 103: 1602-1610
28. Burset M, Selodtsov IA, Solovyev (2000): Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* 28 4364-4375
29. Byers PH (2002): Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. *J. Clin. Invest.* 109: 3-6
30. Cabrera M, Nghiem Y, Miller JH (1988): mutM, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G:C→T:A transversions. *J. Bacteriol.* 170: 5405-5407
31. Calvert PM, Frucht H (2002): The genetics of colorectal cancer. *Ann. Intern. Med.* 137: 603-612
32. Cardoso J, Molenaar L, de Menezes RX, van Leerdam M, Rosenberg C, Möslein G, Sampson J, Morreau H, Boer JM, Fodde R (2006) : Chromosomal instability in MYH- and APC-mutant adenomatous polyps. *Cancer Res.* 66: 2514-2519
33. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002): Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* 3: 285-298
34. Celestino A, Castillo T, Frisancho O, Contardo C, Espejo H, Tomioka C, Navarrete J (1996): Colorectal Cancer: study on 365 cases. *Rev. Gastroenterol. Peru* 16: 187-196
35. Chan TL, Zhao W, Cancer Genome Project, Leung SY, Yuen ST (2003): BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res.* 63: 4878-4881
36. Charlet B, Logan P, Singh G, Cooper TA (2002): Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell-type specific alternative splicing. *Mol. Cell* 9: 649-658

37. Cheadle JP, Sampson JR (2003): Exposing the MYtH about base excision repair and human disease. *Hum. Mol. Genet.* 12: R159-R165
38. Chmiel H, Golinelli MP, Francis AW, David SS (2001): Efficient recognition of substrates and substrate analogs by the adenine glycosylase MutY requires the C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* 29: 553-564
39. Chmiel NH, Livingston AL, David SS (2003): Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated E.coli enzymes. *J. Mol. Biol.* 327: 431-443
40. Chow E, Lipton L, Lynch E, D'Souza R, Aragona C, Hodgkin L, Brown G, Winship I, Barker M, Buchanan D, Cowie S, Nasioulas S, Du Sart D, Young J, Leggett B, Jass J, Macrae F (2006): Hyperplastic polyposis syndrome: phenotypic presentations and the role of MBD4 and MYH. *Gastroenterology* 131: 30-39
41. Chung DC (2000): The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 119: 854-865
42. Colebatch A, Hitchins M, Williams R, Meagher A, Hawkins NJ, Ward RL (2006): The role of *MYH* and microsatellite instability in the development of sporadic colorectal cancer. *BJC* 1-5
43. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003): Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J.* 17:1195-1214
44. Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, Manno M, Selander T, Aronson M, Redston M, Cotterchio M, Knight J, Gryfe R, Gallinger S (2004): Association between biallelic and monoallelic germline MYH mutations and colorectal cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 96: 1631-1634
45. Croitoru ME, Cleary SP, Berk T, Di Nicola N, Kopolovic I, Bapat B, Gallinger S (2007): Germline MYH mutations in a clinic-based series of Canadian multiple colorectal adenoma patients. *J. Surg. Oncol.* 95: 499-506
46. Denhez F, Lafyatis R (1994): Conservation of regulated alternative splicing and identification of functional domains in vertebrate homologs to the *Drosophila* splicing regulator, suppressor-of-white-apricot. *J. Biol. Chem.* 269: 16170-16179
47. De Ferro SM, Lage P, Suspiro A, Fidalgo P, Fragoso S, Baltazar C, Vitoriano I, Rodrigues P, Albuquerque C, Leitao CN (2007): MYH associated polyposis: severe phenotype in the homozygosity for the 1103delC mutation. *Acta Med. Port.* 20: 243-247
48. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002): Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 1102-1115
49. D'Inca R, Cardin R, Benazzato L, Angriman I, Martines D, Sturniolo GC (2004): Oxidative DNA damage in the mucosa of ulcerative colitis increases with disease duration and displasia. *Inflamm. Bowel Dis.* 10: 23-27
50. Dixon A, Wurm P, Hart A, Robinson R (2006): Distal adenomatous polyps are rare in patients with inflammatory bowel disease. *Postgrad. Med. J.* 82: 76-78
51. Eliason K, Hendrickson BC, Judkins T, Norton M, Leclair B, Lyon E, Ward B, Noll W, Scholl T (2005): The potential for increased clinical sensitivity in genetic testing for polyposis colorectal cancer through the analysis of MYH mutations in North American patients. *J. Med. Genet.* 42: 95-96
52. Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A, Lipton L, Tomlinson I, Kärjä V, Eskelinen M, Mecklin JP, Karhu A, Järvinen H, Aaltonen LA (2003): Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am. J. Pathol.* 163: 827-832
53. Fan J, Wilson DM (2005): Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair. *Free Radic. Biol. Med.* 38: 1121-1138

54. Fante R, Benatti P, di Gregorio C, De Pietri S, Pedroni M, Tamassia MG, Percesepe A, Rossi G, Losi L, Roncucci L, Ponz de Leon M (1997): Colorectal carcinoma in different age groups: a population-based investigation. *Am. J. Gastroenterol.* 92: 1505-1509
55. Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, Wiltshire A, Prendergast J, Porteous M, Campbell H, Dunlop MG (2005): Germline susceptibility to colorectal cancer due to base excision repair gene defects. *Am. J. Hum. Genet.* 77: 112-119
56. Faustino NA, Cooper TA (2003): Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 17: 419-437
57. Fleischmann C, Peto J, Cheadle JP, Shah P, Sampson J, Houlston RS (2004): Comprehensive analysis of the contribution of germline MYH variation to early onset colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 109: 554-558
58. Fornasarig M, Minisini M, Viel A, Quaia M, Canzonieri V, Veronesi A (2006): Twelve Years of endoscopic surveillance in a family carrying biallelic Y165C MYH defect: report of a case. *Dis. Colon Rectum* 49: 1-4
59. Fortini P, Parlanti E, Sidorkina OM, Laval J, Dogliotti E (1999): The type of DNA Glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 274: 15230-15236
60. Fuchs CS, Biovannucci EL, Colditz GA (1994): A prospective study of familial history and risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 331:1669-1674
61. Gammon A, Kohlmann W, Burt R (2007): Can we identify the High-Risk Patients to Be Screened? A Genetic Approach. *Digestion* 76: 7-19
62. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN (1994): Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 35: 1590-1592
63. Gismondi V, Meta M, Bonelli L, Radice P, Sala P, Bertario L, Viel A, Fornasarig M, Arrigoni A, Gentile M, Ponz de Leon M, Anselmi L, Mareni C, Bruzzi P, Varesco L (2004): Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int. J. Cancer* 109: 680-684
64. Görgens H, Krüger S, Kuhlisch E, Pagenstecher C, Höhl R, Schackert HK, Müller A (2006): Microsatellite stable colorectal cancers in clinically suspected Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer patients without vertical transmission of disease are unlike to be caused by biallelic germline mutations in MYH. *J. Mol. Diagn.* 8:178-182
65. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, Wolff E, Burt R, Hughes JP, Warrington J (1991): Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis gene. *Cell* 66: 589-600
66. Grollmann AP, Moriya M (1993): Mutagenesis by 8-oxoguanine: An enemy within. *Trends Genet.* 9:246-249
67. Gschwantler M, Kriwanek S, Langner E, Goritzer B, Schrutka-Kolbl C, Brownstone E, Feichtinger H, Weiss W (2002): High grade dysplasia and invasive carcinoma in colorectal adenomas: a multivariate analysis of the impact of adenoma and patient characteristics. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002; 14: 183-188.
68. Gu Y, Parker A, Wilson TM, Bai H, Chang DY, Lu AL (2002): Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in Base Excision Repair, physically and functionally interacts with Mismatch Repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J. Biol. Chem.* 13: 11135-11142
69. Guan Y, Manuel RC, Arvai AS, Parikh SS, Mol CD, Miller JH, Lloyd RS, Tainer JA (1998): MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily. *Nat. Struct. Biol.* 5:1058-1064
70. Halford SER, Rowan AJ, Lipton L, Sieber OM, Pack K, Thomas HJW, Hodgson SV, Bodmer WF, Tomlinson IPM (2003): Germline mutations but not somatic changes at the MYH locus contribute to the pathogenesis of unselected colorectal cancers. *Am. J. Pathol.* 162: 1545-1548

71. Hamilton SR, Liu B, Pearsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B et al. (1995): The molecular basis of Turcot's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 332, 839-847
72. Hashimoto K, Tominaga Y, Nakabeppu Y, Moriya M (2004): Futile short-patch DNA base excision repair of adenine: 8-oxoguanine mispair. *Nucleic Acids Res.* 32: 5928-5934
73. Hazra TK, Izumi T, Maitt L, Floyd RA, Mitra S (1998): The presence of two distinct 8-oxoguanine repair enzymes in human cells: their potential complementary roles in preventing mutation. *Nucleic Acids Res.* 26: 5116-5122
74. Hazra TK, Izumi T, Kow YW, Mitra S (2003): The discovery of a new family of mammalian enzymes for repair of oxidatively damaged DNA and its physiological implications. *Carcinogenesis* 24: 155-157
75. Hernegger GS, Moore HG, Guillem JG (2002): Attenuated familial adenomatous polyposis: an evolving and poorly understood entity. *Dis. Colon Rectum* 45:127-134
76. Hoeijmakers JH (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374
77. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991): p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-52
78. Honchel R, Halling KC, Schaid DJ, Pittelkow M, Thibodeau SN (1994): Mikrosatellite instability in Muir-Torre syndrome. *Cancer Res.* 54: 1159-1163
79. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Järvinen HJ, Sistonen P, Tomlinson IP, Houlston RS, Bevan S, Mitros FA, Stone EM, Aaltonen LA (1998): Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 280: 1086-1088
80. Huang CS, O'Brien MJO, Yang S, Farraye FA (2004): Hyperplastic Polyps, serrated adenomas and the serrated neoplasia pathway. *Am. J. Gastroenterol.* 99: 2242-2255
81. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC (2002): Radical causes of cancer. *Nature Rev. Cancer* 276: 276-285
82. Ide H, Kotera M (2004): Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 480-485
83. Isidro G, Laranjeira F, Pires A, Leite J, Regateiro F, Castro e Sousa F, Soares J, Castro C, Giria J, Brito MJ, Medeira A, Teixeira R, Morna H, Gaspar I, Marinho C, Jorge R, Brehm A, Ramos JS, Boavida MG (2004): Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum. Mutat.* 24: 353-360
84. Itzkowitz SH (2002): Cancer prevention in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 31: 1133-1144
85. Itzkowitz SH, Yio X (2004): Inflammation and Cancer. IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287: G7-G17
86. Jackman R, Mayo C (1951): The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg. Gynecol. Obstet.* 93: 327
87. Jaiswal M, Lipinski LJ, Bohr VA, Mazur SJ (1998): Efficient in vitro repair of 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine by human cell extracts: involvement of multiple pathways. *Nucleic Acids Res.* 26: 2184-2191
88. Jaiswal M, La Russo NF, Gores GJ (2001): Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281: G626- G634
89. Jenkins MA, Croitoru M, Neerav M, Cleary SP, Cotterchio M, Hopper JL, Gallinger S (2005): Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MYH mutations: a population-based case-family study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15: 312-314

90. Jess T, Gamborg M, Matzen P, Munkholm P, Sorensen TIA (2005): Increased Risk of Intestinal Cancer in Crohn's Disease: A Meta-Analysis of Population-Based Cohort Studies. *Am. J. Gastroenterol* 100: 2724-2729
91. Jo WS, Chung DC (2005): Genetics of Hereditary Colorectal Cancer. *Semin Oncol* 32: 11-23
92. Johns LF, Houlston RF (2001): A systematic review and metaanalysis of familial colorectal cancer risk. *Am. J. Gastroenterol.* 96: 2992-3003
93. Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best J, Jordan S, Williams GT, Sampson JR, Cheadle JP (2002): Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C→T:A mutations. *Hum. Mol. Genet.* 11: 2961-2967
94. Kairupan CF, Meldrum CJ, Crooks R, Milward EA, Spigelman AD, Burgess B, Groombridge C, Kirk J, Tucker K, Ward R, Williams R, Scott RJ (2005): Mutation analysis of the MYH gene in an Australian series of colorectal polyposis patients with or without germline APC mutations. *Int. J. Cancer* 116: 73-77
95. Kambara T, Whitehall VLJ, Spring KJ, Barker MA, Arnold S, Wynter CVA, Matsubara N, Tanaka N, Young JP, Leggett BA, Jass JR (2004): Role of inherited defects of MYH in the development of sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 40: 1-9
96. Kanter-Smoler G, Bjork J, Fritzell K, Engwall Y, Hallberg B, Karlsson G, Gronberg H, Karlsson P, Wallgren A, Wahlstrom J, Hultcrantz R, Nordling M (2006): Novel findings in Swedish patients with MYH-associated polyposis: Mutation detection and clinical characterization. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4: 499-506
97. Kim CJ, Cho JG, Park CH, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS (2004): Genetic alterations of the MYH gene in gastric cancer. *Oncogene* 23: 6820-6822
98. Kim DW, Kim IJ, Kang HC, Jang SG, Kim K, Yoon HJ, Ahn SA, Han SY, Hong SH, Hwang JA, Sohn DK, Jeong SY, Choi HS, Hong CW, Lim SB, Park JG (2007): Germline mutations of the MYH gene in Korean patients with multiple colorectal adenomas. *Int. J. Colorectal Dis.* 22: 1173-1178
99. Kinzler K, Vogelstein B (1997): Cancer-susceptibility genes: Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386: 761-763
100. Knudson AG Jr (1985): Hereditary cancer oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res.* 45: 1437-1443
101. Komarova NL, Wang L (2004): Initiation of colorectal cancer, where do the two hits hit? *Cell Cycle* 3: 1558
102. Kozak M (1991): An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115: 887-903
103. Kozak M (1999): Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 243: 187-208
104. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992): The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes. *Hum. Genet.* 90: 41-54
105. Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schar P, Barnes DE, Lindahl T (1996): Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein. *EMBO J.* 15: 6662-6670
106. Kumar VKA, Gold JA, Mallon E, Thomas S, Hodgson SV (2007): Sebaceous adenomas in an MYH associated polyposis patient of Indian (Gujarati) origin. *Familial cancer* 7: 187-189
107. Ladd AN, Cooper TA (2002): Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. *Genome Biol.* 3: 8.1-8.16
108. Lal G, Gallinger S (2000): Familial adenomatous polyposis. *Semin. Surg. Oncol.* 18: 314-323
109. Leeuwen van IMM, Byrne HM, Jensen OE, King JR (2006): Crypt dynamics and colorectal cancer: advances in mathematical modelling. *Cell Prolif.* 39: 157-181

110. Leite JS, Isidro G, Martins M, Regateiro F, Albuquerque O, Amaro P, Romaozinho JM, Boavida G, Castro-Sousa F (2005): Is prophylactic colectomy indicated in patients with MYH-associated polyposis? *Colorectal Dis.* 7: 327-331
111. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997): Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386: 623-627
112. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC (2002): The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br. J. Surg.* 89: 845-860
113. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kapirio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K (2000): Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analysis of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *N. Engl. J. Med* 343: 78-85
114. Lieberman DA, Prindiville S, Weiss D, Willett W (2003): Risk factors for advanced colonic Neoplasia and hyperplastic Polyps in asymptomatic individuals. *JAMA* 290: 2959-2967
115. Lim LP, Burge CB (2001): A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 1193-1198
116. Lipton L, Halford SE, Johnson V, Novelli MR, Jones A, Cummings C, Barclay E, Sieber OM, Sadat A, Bisgaard ML, Hodgson SV, Aaltonen LA, Thomas HJW, Tomlinson IPM (2003): Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *J. Cancer Res.* 63: 7595-7599
117. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP (1997): The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 885-888
118. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjonneland A, Overvad K, Poulsen HE (1992): Oxidative DNA-damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in man: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 13: 2241-2247
119. Loft S, Poulsen HE (1996): Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* 74: 297-312
120. Longy M, Lacombe D, (1996): Cowden disease. Report of a family and review. *Ann. Genet.* 39: 35-42
121. Lothe RA, Andersen SN, Hofstad B, Meling GI, Peltomaki P, Heim S, Brogger A, Vatn M, Rognum TO, Borresen AL (1995): Deletion of 1p loci and microsatellite instability in colorectal polyps. *Genes Chromosomes Cancer* 14: 182-188
122. Lynch HT, Smyrk T, Mc Ginn T, Lanspa S, Cavalieri J, Lynch J, Slominski-Castor S, Cayouette MC, Priluck I, Luce MC (1995) Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): A phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* 76: 2427-2433
123. Lynch HT, de la Chapelle (1999): Genetic susceptibility to non polyposis colorectal cancer. *J. Med. Genet.* 36: 801-818
124. Lynch HT, Lynch J (2000): Lynch syndrome: genetics, natural history, genetic counseling and prevention. *J. Clin. Oncol.* 18: 19S-31S
125. Maki H, Sekiguchi M (1992): MutT protein specifically hydrolyzes a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355: 273-275
126. Manitas T, Tasic B (2002): Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418: 236-243
127. Manuel RC, Lloyd RS (1997): Cloning, overexpression, and biochemical characterization of the catalytic domain of MutY. *Biochemistry* 36: 11140-11152
128. Marnett LJ (2000): Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-370
129. Mc Garrity TJ, Kulin HE, Zaino RJ (2000): Peutz-Jeghers syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 95: 596-604

130. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF (1996): Evidence of Oxidant-induced injury to Epithelial Cells during Inflammatory Bowel Disease. *J. Clin. Invest.* 98: 136-41
131. Michaels LM, Miller JH (1992): The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine. *J. Bacteriol.* 174:6321-6325
132. Miyaki M, Iijima T, Hishima T, Tamura K, Utsunomiya J, Mori T (2005): Germline mutations of the MYH gene in Japanese patients with multiple colorectal adenomas. *Mutat. Res.* 578: 430-433
133. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horri A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y (1992): Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum. Mol. Genet.* 1: 229-233
134. Modrek B, Lee C (2002): A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.* 30: 13-19
135. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (51 Pt 1) 263-273.
136. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V (1993): Intestinal cancer risk and mortality in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 105: 1716-1723
137. Nagase H, Miyoshi Y, Horii A (1992): Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 52: 4055-4057
138. Nielsen M, Franken PF, Reinards THCM, Weiss MM, Wagner A, van der Klift H, Kloosterman S, Houwing-Duistermaat JJ, Aalfs CM, Ausems MGEM, Bröcker-Vriends AHJT, Gomez-Garcia EB, Hoogerbrugge N, Menko FH, Sijmons RH, Verhoef S, Kuipers EJ, Morreau H, Breuning MH, Tops CMJ, Wijnen JT, Vasen HFA, Fodde R, Hes FJ (2005): Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP). *J. Med. Genet.* 42: 54-62
139. Nghiem Y, Cabrera M, Cupples CG, Miller JH (1988): The mutY gene: a mutator locus in *Escherichia coli* that generates G:C→T:A transversions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2709-2713
140. Nguyen HN, Walker S, Fritz P, Kreichgauer HP, Baum KD, Bode JC (1991): The localization of colorectal polyps and carcinomas in relation to their size and the histological findings. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 116: 1041-1046
141. Noll DM, Gogos A, Granek JA, Clarke ND (1999): The C-terminal domain of the adenine-DNA glycosylase MutY confers specificity for 8-oxoguanine: adenine mispairs and may have evolved from MutT, an 8-oxo-dGTPase. *Biochemistry* 38: 6374-6379
142. Oda Y, Uesugi S, Ikehara M, Nishimura S, Kawase Y, Ishikawa H, Inoue H, Ohtsuka E (1991): NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine. *Nucleic Acids Res.* 19: 1407-1412
143. Ohtsubo T, Nishioka K, Imaiso Y, Iwai S, Shimokawa H, Oda H, Fujiwara T, Nakabeppu Y (2000): Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 28: 1355-1364
144. Olschwang S, Blanche H, Moncuit C, Thomas G (2007): Similar colorectal cancer risk in patients with monoallelic and biallelic mutations of the MYH gene identified in a population with adenomatous polyposis. *Genetic Testing* 11: 315-320
145. Otori K, Oda Y, Sugiyama K, Hasebe T, Mukai K, Fujii T, Tajiri H, Yoshida S, Fukushima S, Esumi H (1997): High frequency of K-ras mutations in human colorectal hyperplastic polyps. *Gut* 40: 660-663
146. Paluszkiwicz P, Wallner G, Bury P, Mizerski P (2005): Colorectal cancer patients treated in surgical departments of the Lublin region- clinical and pathologic features obtained from the Lublin Colorectal Cancer Registry. *Wiad. Lek.* 58: 36-40
147. Patel AA, Steitz JA (2003): Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 960-970

148. Parker A, Gu Y, Mahoney W, Lee SH, Singh KK, Lu AL (2001): Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair. *J. Biol. Chem.* 276: 5547-5555
149. Persson PG, Karlen P, Bernell O, Leijonmarck CE, Brostrom O, Ahlbom A, Hellers G (1994): Crohn's disease and cancer: a population- based cohort study. *Gastroenterology* 107: 1675-1769
150. Peterlongo P, Mitra N, Sanchez de Abajo A, de la Hoya M, Bassi C, Bertario L, Radice P, Glogowski E, Nafa K, Caldes T, Offit K, Ellis NA (2006): Increased frequency of disease-causing MYH mutations in colon cancer families. *Carcinogenesis* 27: 2243-2249
151. Ponti G, Ponz de Leon M, Maffei S, Pedroni M, Losi L, Di Gregorio C, Gismondi V, Scarselli A, Benatti P, Roncari B, Seidenari S, Pellacani G, Varotti C, Prete E, Varesco L, Roncucci L (2005): Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations. *Clin Genet* 68: 442-447
152. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359: 235-237
153. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM (1993): Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.* 329: 1982-1987
154. Raithel M, Weidenhiller M, Schwab D, Müller S, Hahn EG (2001): Pathobiology of dysplasia in chronic inflammatory bowel disease: Current recommendations for surveillance of dysplasia. *Z. Gastroenterol.* 39: 861-875
155. Raouf M, Canter RJ, Paty PB (2007): Variable phenotypic expression of identical MYH germline mutations in siblings with attenuated familial adenomatous polyposis. *Am. Surg.* 73: 1250-1253
156. Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A (1997): In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 9463-9468
157. Redston MS, Papadopoulos N, Caldas C, Kinzler KW, Kern SE (1995): Common occurrence of APC and k-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology* 108: 383-392
158. Renkonen ET, Nieminen P, Abdel-Rahman WM, Moisio AL, Järvelä I, Heikki SA, Järvinen J, Peltomäki P (2005): Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous. *J. Clin. Oncol.* 23: 5651-5659
159. Rex DK, Lehman GA, Hawes RH, Ulbright TM, Smith JJ (1991): Screening colonoscopy in asymptomatic average-risk persons with negative fecal occult blood tests. *Gastroenterology* 100: 64-67
160. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V (1998): Nuclear factor NF κ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115: 357-369
161. Roldan-Arjona T, Wei YF, Carter KC, Klungland A, Anselmino C, Wang RP, Augustus M, Lindahl T (1997): Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8016-8020
162. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P (1996): Binding of GSK-3 β to the APC- β -Catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272: 1023-1026
163. Russell AM, Zhang J, Luz J, Hutter P, Chappuis PO, Berthod CR, Maillet P, Müller H, Heinimann K (2006): Prevalence of MYH germline mutations in Swiss APC-negative polyposis patients. *Int. J. Cancer* 118: 1937-1940
164. Russo MT, De Luca G, Degan P, Bignami M (2006): Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. *Mutat. Res.* 614: 69-76

165. Sakumi K, Furuichi M, Tsuzuki T, Kakuma T, Kawabeta S, Maki H, Sekiguchi M (1993): Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 268: 23524-23530
166. Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, Frayling I, Jordan S, Maher ER, Mak T, Maynard J, Pigatto F, Shaw J, Ceadle JP (2003): Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *The Lancet* 362: 39-41
167. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
168. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, Dixon FM, Fenoglio-Preiser CM, Fléjou JF, Geboes K, Hattori T, Hirota T, Itabashi M, Iwafuchi M, Iwashita A, Kim YI, Kirchner T, Klimpfinger M, Koike M, Lauwers GY, Lewin KJ, Oberhuber G, Offner F, A, Price AB, Rubio CA, Shimizu M, Shimoda T, Sipponen M, Solcia E, Stolte M, Watanabe H, Yamabe H (2000): The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 47: 251-255
169. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP (1991): Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349: 431-434
170. Shinmura K, Yamaguchi S, Saitoh T, Takeuchi-Sasaki M, Kim SR, Nohmi T, Yokota J (2000): Adenine excisional repair function of MYH protein on the adenine:8-hydroxyguanine base pair in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 28: 4912-4918
171. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M (1996): Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 39: 690-697
172. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RKS, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson DM, Thomas HJW, Tomlinson IPM (2003): Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N. Engl. J. Med* 348: 791-799
173. Sieber OM, Howarth KM, Thirlwell C, Rowan A, Mandir N, Goodland RA, Gilkar A, Spencer-Dene B, Stamp G, Johnson V, Silver A, Yang H, Miller JH, Ilyas M, Tomlinson IPM (2004): MYH deficiency enhances intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia APC (Min/+) mice. *Cancer Res.* 61: 8876-8881
174. Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF (1996): Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111: 871-885
175. Slupska MM, Baikalov C, Luther WM, Chiang JH, Wei YF, Miller JH (1996): Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli MutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* 178: 3885-3892
176. Slupska MM, Luther WM, Chiang JH, Yang H, Miller JH (1999): Functional expression of hMYH a human homolog of the Escherichia coli MutY protein. *J. Bacteriol.* 181: 6210-6213
177. Smith CWJ, Valcarcel J (2000): Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 25: 381-388
178. Steenken S (1989): Purine bases, nucleosides and nucleotides: Aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and OH adducts. *Chem. Rev.* 89: 503-520
179. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B (2000): The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.* 342: 1946-1952
180. St. John DJ, McDermott FT, Hopper JL, Debney EA, Johnson WR, Hughes ES (1993): Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 329, 1982-1987
181. Strate LL, Syngal S (2005): Hereditary colorectal cancer Syndromes. *Cancer Causes Control* 16: 201-213

182. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology* 1987; 93: 1009-1013.
183. Su LK, Barnes CJ, Yao W, Qi J, Lynch P, Steinbach G (2000): Inactivation of germline mutant APC alleles by attenuated somatic mutations: A molecular genetic mechanism for attenuated familial adenomatous polyposis. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 582-590
184. Sun H, Chasin LA (2000): Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol. Cell Biol* 20: 6414-6425
185. Takao M, Aburatani H, Kobayashi K, Yasui A (1998): Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 26: 2917-2922
186. Takao M, Zhang QM, Yonei S, Yasui A (1999): Differential subcellular localization of human MutY homolog (hMYH) and the functional activity of adenine:8-oxoguanine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.* 27: 3638-3644
187. Tao H, Shinmura K, Hanoaka T, Natsukawa S, Shaura K, Koizumi Y, Kasuga Y, Ozawa T, Tsujinaka T, Li Z, Yamaguchi S, Yokota J, Sugimura H, Tsugane S (2004): A novel splice-site variant of base excision repair gene MYH is associated with production of an aberrant mRNA transcript encoding a truncated MYH protein not localized in the nucleus. *Carcinogenesis* 25: 1859-1866
188. Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Grollman AP, Nishimura S (1991): 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 4690-4694
189. Tetsu O, McCormick F (1999): Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398: 422-426
190. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819
191. Truta B, Allen BA, Conrad PG, Weinberg V, Miller GA, Pomponio R, Lipton LR, Guerra G, Tomlinson IP, Sleisenger MH, Kim YS, Terdiman JP (2005): A comparison of the phenotype and genotype in adenomatous polyposis patients with and without a family history. *Fam. Cancer* 4: 127-133
192. Tsai-Wu JJ, Liu HF, Lu AL (1992): Escherichia coli MutY protein has both N-glycosylase and apurinic/aprimidinic endonuclease activities on A-C and A-G mispairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 8779-8783
193. Tsai-Wu JJ, Su HT, Wu JL, Hsu SM, Wu CHH (2000): Nuclear localization of the human mutY homologue hMYH. *J. Cell. Biochem.* 77: 666-677
194. Valko M, Izakovic M, Rhodes C, Telser J (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266: 37-56
195. Varesco L (2004): Familial adenomatous polyposis: genetics and epidemiology. *Tech. Coloproctol.* 8: 305-308
196. Venesio T, Molatore S, Cattaneo F, Arrigoni A, Risio M, Ranzani GN (2004): High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 126: 1681-1685
197. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319: 525-532
198. Wallis YL, Macdonald F, Hulten M, Morton JE, McKeown CM, (1994) Genotype-Phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis. *Hum. Genet.* 94: 543-548
199. Wang L, Baudhuin LM, Boardman LA, Steenblock KJ, Petersen GM, Halling KC, French AJ, Johnson RA, Burgart LJ, Rabe K, Lindor NM, Thibodeau SN (2004): MYH mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps. *Gastroenterology* 127: 9-16

-
200. Whitelaw SC, Murday VA, Tomlinson IP, Thomas HJ, Cottrell S, Ginsberg A, Bukofzer S, Hodgson SV, Skudowitz RB, Jass JR, Talbot IC, Northover JM, Bodmer WF, Solomon E (1997): Clinical and molecular features of the hereditary mixed polyposis syndrome. *Gastroenterology* 112: 327-334
201. Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL (1991): Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 2692-2696
202. Yamaguchi S, Shinmura K, Saitoh T, Takenoshita S, Kuwano H, Yukota J (2002): A single nucleotide polymorphism at the splice donor site of the human MYH base excision repair gene results in reduced translation efficiency of its transcripts. *Genes Cells* 7: 461-474
203. Yanofsky C, Cox EC, Horn V (1996): The unusual mutagenic specificity of an E.coli mutator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55: 274-281
204. Zhang MQ (1998): Statistical features of human exons and their flanking regions. *Hum. Mol. Genet.* 7: 919-932

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beim kolorektalen Karzinom häufig mutierte Protoonkogene und Tumorsuppressorgene.....	12
Tabelle 2: Studienpatienten und ihre Diagnosen.....	41
Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen Puffer zur PCR-Optimierung.....	47
Tabelle 4: Pipettierschema für die Herstellung einer cDNA aus RNA.....	49
Tabelle 5: Thermocycler-Temperaturschema für die Amplifikation von cDNA.....	49
Tabelle 6: Thermocycler-Temperaturschema einer Sequenzierungs-PCR.....	51
Tabelle 7: Thermocycler-Temperaturschema zur Durchführung der <i>site-directed-mutagenesis</i>	55
Tabelle 8: Charakteristika der Restriktionsenzyme <i>Bgl</i> III und <i>Mwo</i> I.....	60
Tabelle 9: PCR-Fragmente zur Analyse des <i>MYH</i> -Introns 1.....	67
Tabelle 10: Charakteristika der gesunden Probanden.....	69
Tabelle 11: Patienten mit kolorektalen Adenomen und/oder Karzinomen.....	70
Tabelle 12: Größe und Dysplasiegrad aller 506 histologisch untersuchten Adenome.....	70
Tabelle 13: Lokalisation der 506 identifizierten Adenome.....	70
Tabelle 14: Größe und Dysplasiegrad in Abhängigkeit von der Adenomzahl.....	71
Tabelle 15: Adenomgröße und Dysplasiegrad bei biallelischer <i>MYH</i> -Mutation.....	73
Tabelle 16: Adenomverteilung im Kolon bei biallelischer <i>MYH</i> -Mutation.....	73
Tabelle 17: Charakteristika der Patienten mit CED.....	74
Tabelle 18: Übersicht über die Y165C- und G382D-Mutationsanalyse im Gesamtkollektiv.....	75
Tabelle 19: Charakteristika der Gruppe von Patienten mit multiplen Adenomen.....	77
Tabelle 20: Mutationsstatus und Klinik der Patienten mit nachgewiesener <i>MYH</i> -Genvariante.....	79
Tabelle 21: Intronvarianten der bei der Transkriptanalyse untersuchten Probanden.....	84
Tabelle 22: Häufigkeit der alternativen Exon 3-Formen bei den 267 bp- α -Produkten (H177 und V1).....	87
Tabelle 23: Häufigkeit der Exon 3-Varianten bei den 578bp- α -Produkten (H177 und V1).....	89
Tabelle 24: Übersicht über die bisher nicht bekannten Spleißvarianten der α -Transkripte (H177 und V1).....	92
Tabelle 25: Verteilung der Exon 3-Formen der α -Transkripte und Anzahl der auffälligen Formen.....	93
Tabelle 26: Alternative Exon 3-Formen bei den 543 bp β -Produkten (H177 und V1).....	94
Tabelle 27: Alternative Exon 3-Formen bei den 614 bp- β -Produkten (H177 und V2).....	98
Tabelle 28: Übersicht über die nachgewiesenen Spleißvarianten der β -Transkripte (H177, V1 und V2).....	99
Tabelle 29: Verteilung der Exon 3-Formen der β -Transkripte und Anzahl der auffälligen Formen.....	100
Tabelle 30: Übersicht der beschriebenen sehr wahrscheinlich pathogenen <i>MYH</i> -Mutationen.....	104
Tabelle 31: Übersicht der Varianten mit unbekannter Bedeutung.....	107
Tabelle 32: Übersicht der bekannten Intronpolymorphismen.....	108
Tabelle 33: Dysplasiegrad der Adenome des Patienten H503 in Abhängigkeit von ihrer Größe.....	115
Tabelle 34: Konsequenzen der alternativen Exon 3-Formen 1-4 auf Proteinebene.....	124
Tabelle 35: Konsequenzen der neuen Exon 3-Formen.....	125
Tabelle 36: Konfiguration der verschiedenen 3'-Spleißstellen der Exon 3-Varianten.....	126
Tabelle 37: Konsequenzen der Spleißvarianten auf Proteinebene im Überblick.....	129
Tabelle 38: Verschiedene 5'-Spleißstellen des Exons 1 α im Vergleich mit der Konsensussequenz.....	130
Tabelle 39: Neu genutzte 5'-Spleißstelle bei der Deletion von 56 bp aus Exon 3.....	130
Tabelle 40: Die 5'-Spleißstellen bei Varianten des Exons 1 β	131
Tabelle 41: Das 141 bp- und das 150 bp-Insert aus Intron 1 und ihre Spleißstellen.....	134

12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genetisches Tumorprogressionsmodell beim kolorektalen Karzinom.....	13
Abbildung 2: 8-oxoG: Struktur und Paarungsverhalten.....	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Abläufe bei der <i>base-excision-repair</i> (BER).....	19
Abbildung 4: Funktionsweise des GO-Systems bei der DNA-Reparatur.....	21
Abbildung 5: Genstruktur von <i>MYH</i> und bp-Länge von Exons und Introns.....	24
Abbildung 6: Stammbaum der Familie N.....	26
Abbildung 7: Wichtige Spleißsignale im Intron.....	32
Abbildung 8: PCR-Produkt zur Analyse des <i>MYH</i> -Exons 7.....	57
Abbildung 9: PCR-Produkt zur Analyse des <i>MYH</i> -Exons 13.....	57
Abbildung 10: Agarosegel der <i>MYH</i> -Exon-7 PCR-Produkte.....	58
Abbildung 11: Agarosegel der <i>MYH</i> -Exon 13 PCR-Produkte.....	59
Abbildung 12: Entstehung der Erkennungssequenz von <i>MwoI</i> durch die Y165C Mutation.....	60
Abbildung 13: Entstehung der Erkennungssequenz von <i>BgIII</i> durch die G382D Mutation.....	61
Abbildung 14: Restriktionsverdau der <i>MYH</i> -Exon 7-PCR-Produkte.....	62
Abbildung 15: Restriktionsverdau der <i>MYH</i> -Exon 13-PCR-Produkte.....	63
Abbildung 16: Intensität der DNA-Banden nach Restriktionsverdau im Zeitverlauf.....	63
Abbildung 17: PCR-Amplifikation der Exons 3-14.....	64
Abbildung 18: PCR-Amplifikation der <i>MYH</i> -Exon 1 Formen.....	65
Abbildung 19: PCR-Amplifikation des <i>MYH</i> -Exons 2.....	65
Abbildung 20: Agarosegel der PCR-Produkte der <i>MYH</i> -Exons 1-14.....	65
Abbildung 21: Sequenzen bekannter Varianten unklarer Pathogenität.....	77
Abbildung 22: Die IVS 6+35 G>A-Variante.....	78
Abbildung 23: Compound heterozygoter Mutationsstatus (Y165C/G382D) bei Patient H503.....	82
Abbildung 24: Schematische Darstellung der vier bei der Spleißanalyse untersuchten cDNA-Fragmente.....	83
Abbildung 25: Polymorphismen im Intron 1 von <i>MYH</i>	84
Abbildung 26: Agarosegel der α -cDNA-Amplifikate zur Spleißanalyse.....	85
Abbildung 27: Die alternativen Exon 3-Spleißformen.....	86
Abbildung 28: Nomenklatur der <i>MYH</i> -Transkripte.....	87
Abbildung 29: Schema zur Deletion von GTGG am Ende von Exon 1 α	88
Abbildung 30: Schematische Darstellung der Variante 6 des Exons 3.....	88
Abbildung 31: Schematische Darstellung des um 16 bp verlängerten Exons 1 α	89
Abbildung 32: Deletion und Insertion größerer Genabschnitte im Fall der α -Produkte (H177 und V1).....	90
Abbildung 33: Kombinationen von Spleißvarianten bei den α -Transkripten (H177 und V1).....	91
Abbildung 34: Agarosegel der β -cDNA-Amplifikate zur Spleißanalyse.....	93
Abbildung 35: Schematische Darstellung der Spleißvariante mit einem 237 bp-Insert aus Intron 1.....	95
Abbildung 36: Schematische Darstellung einer komplexen Spleißvariante.....	95
Abbildung 37: Schematische Darstellung des 141 bp-Inserts aus Intron 1.....	95
Abbildung 38: Schematische Darstellung der Variante 5 des Exons 3.....	96
Abbildung 39: Deletion und Insertion größerer Genabschnitte im Fall der β -Produkte (H177 und V1).....	96
Abbildung 40: Schematische Darstellung des 150 bp-Inserts aus Intron 1.....	97
Abbildung 41: Schematische Darstellung der 56 bp-Deletion in Exon 3.....	97
Abbildung 42: Anzahl der im Verlauf bei dem Patienten H503 pro Jahr entfernten Adenome.....	112
Abbildung 43: Schema zur Adenomentstehung bei biallelischer <i>MYH</i> -Mutation.....	113
Abbildung 44: Theorie zur Adenomentstehung bei monoallelischer <i>MYH</i> -Mutation.....	120
Abbildung 45: Mögliche Startkodons bei α -, β - und γ -Transkripten.....	123
Abbildung 46: Theorie zur Entstehung von Neoplasien bei CED und monoallelischer <i>MYH</i> -Mutation.....	136
Abbildung 47: Algorithmus zur Genanalyse bei Verdacht auf hereditäres KRK oder Polyposissyndrom.....	139
Abbildung 48: Klinisches Vorgehen bei Patienten mit sicherer <i>MYH</i> -Genvariante und deren Angehörigen.....	141

13 Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acids</i> / Aminosäuren
A	Adenin
AFAP	Attenuierte familiäre adenomatöse Polyposis
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APE1	<i>apurinic endonuclease 1</i>
AP	<i>apurinic / apyrimidinic</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BER	<i>Base Excision Repair</i> / Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar(e)
BRE	<i>transcription factor IIb recognition element</i>
C	Cytosin
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CED	Chronisch-entzündliche-Darmerkrankung
CHRPE	<i>Congenital hypertrophy of the retinal pigmented epithelium</i>
CTNNB1	<i>Cadherin-associated protein beta</i>
CTP	Cytidintriphosphat
d	desoxy
DCC	<i>Deleted in colorectal carcinoma</i> Onkogen
ddNTP	2', 3'-Didesoxy-Nucleosid-5'Triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i> / im Exon lokalisierte spleißfördernde Sequenz
ESS	<i>Exonic splicing silencer</i> / im Intron lokalisierte spleißhemmende Sequenz
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FEN1	<i>Flap endonuclease 1</i>
fs	<i>frameshift</i> / Rasterschub
G	Guanin
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase-3 β
gSP	genspezifischer Primer
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HhH	<i>Helix-hairpin-helix</i> -Motiv
HMPS	<i>Hereditary mixed polyposis syndrome</i>
HNPCC	<i>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</i> / Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
HP	Hyperplastischer Polyp
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i> (engl. für CED)
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ISE	<i>Intronic splicing enhancer</i> / intronische spleißfördernde Sequenz
ISS	<i>Intronic splicing silencer</i> / intronische spleißhemmende Sequenz
IVS	<i>Intervening sequence</i> / Intron
kb	Kilobasenpaar(e)
<i>K_m</i>	Michaelis-Menten-Konstante
<i>K_{cat}</i>	Katalytische Konstante
K-ras	Protoonkogen (erstmal im <i>Kirsten murine sarcoma virus</i> isoliertes GTP-bindendes Protein)
KRK	Kolorektales Karzinom
LB	<i>Luria Broth</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> / Allelverlust

LP-BER	<i>long patch</i> BER
M	Mol
min	Minute
MMR	<i>Mismatch repair</i> / Mismatchreparatur MLH
MLH	humanes MutL-Homolog
MSH	humanes MutS-Homolog
MTH	humanes MutT-Homolog
MYH	humanes MutY-Homolog
NaOH	Natriumhydroxid
NER	<i>Nucleotide excision repair</i> / Nukleotidexzisionsreparatur
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	<i>Non-steroidal anti-inflammatory drug</i> / Nichtsteroidale Antirheumatika
8-oxoG	8-oxoguanin
8-oxodG	8-desoxyoxoguanin
OGG1	8-oxoguanine DNA-glycosylase 1
p	kurzer Arm eines Chromosoms
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMS1/2	<i>Post meiotic segregation protein 1/2</i>
q	langer Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	<i>Replication protein A</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> / Reaktive Sauerstoffformen
rpm	<i>Rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoproteins</i> / kleine nukleäre Ribonukleoproteine
SP-BER	<i>Short patch</i> BER
SRC	Onkogen (erstmal im <i>Rous sarcoma virus</i> isolierte Proteinkinase)
T	Thymidin
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCF-4	<i>T-cell factor 4</i> Transkriptionsfaktor
TEA	Thrombendarteriektomie
TTP	Thymidintriphosphat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- β -D-Galaktosid
XRCC1	<i>X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 1</i>

14 Danksagung

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente und Recherchen wurden im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt. Ich danke Herrn Professor Dr. Stefan Zeuzem und Herrn Professor Dr. Frank Lammert für die Möglichkeit im Labor der Klinik arbeiten zu dürfen und für die Überlassung der Arbeitsmaterialien und Geräte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Jochen Rädle für die hervorragende klinische Betreuung und Planung des Projektes sowie für die stetige Bereitschaft anfallende Probleme rasch zu lösen. Nicht zuletzt hat er mir als wissenschaftliches Vorbild den Spaß an der medizinischen Forschung vermittelt.

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Guido Plotz für die nicht genug zu würdigende Betreuung und Unterstützung im Labor. Ihm ist es zu verdanken, dass ich diese Arbeit in Angriff genommen habe. Mit seiner freundlichen und motivierenden Art, seinem offenen Ohr und der Bereitschaft neue Ideen experimentell umzusetzen, hat er maßgeblich dafür gesorgt, dass die Arbeit in dieser Form fertiggestellt werden konnte.

Bei Herrn Marc Wormek bedanke ich mich für die sehr gute praktische Anleitung im Labor und für die ständige Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Bernd Jüngling für die Initiierung des Projektes und für seine Hilfe bei der Beschaffung klinischer Daten der untersuchten Patienten.

Den Mitarbeitern des Gastroenterologie-Labors danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre, ihre fachliche Unterstützung und die anregenden Diskussionen. Dem Team der Endoskopie danke ich für die Entnahme, Aufbewahrung und Weiterleitung der Proben.

Danken möchte ich auch Peter Kaufmann, Margret Emanuel und meiner Freundin Sarah für das sorgfältige Korrekturlesen verschiedener Entwicklungsstufen der Arbeit. Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie und natürlich meiner Freundin, die in letzter Zeit des Öfteren auf mich verzichten mussten, mich aber immer in meiner Arbeit unterstützt und nach Misserfolgen wieder aufgebaut haben.

15 Eigene Publikationen und Lebenslauf

Posterpräsentation 62. Jahrestagung der DGVS 12.-15.9.2007:

Casper M, Plotz G, Jüngling B, Wormek M, Zeuzem S, Rädle J (2007): Prospektive Evaluation der *MYH*-Hotspotmutationen Y165C und G382D bei 352 Patienten mit erfolgter Koloskopie. Z. Gastroenterol. 45: 815 Abstact 247

Ausgewählter Postervortrag 23. Jahrestagung der GARPS 23.-26.10.2008:

Casper M, Plotz G, Jüngling B, Trojan J, Lammert F, Rädle J (2008): Prospektive Bestimmung des *MYH*-Mutationsstatus als Ursache für die Adenomentstehung bei 352 koloskopierte Patienten.

Eingereichte Arbeiten:

Originalarbeit:

Casper M, Plotz G, Jüngling B, Trojan J, Zeuzem S, Raedle J (2008): Course of adenoma-development in *MYH*-associated polyposis (MAP): implications for genetic testing. submitted

Abstract:

Casper M, Plotz G, Zeuzem S, Lammert F, Raedle J: Prospective evaluation of *MYH* germline variants in 352 colonoscopy patients. Digestive Disease Week 2009

Lebenslauf:

Markus Casper

15.05.1982: Geboren in St.Wendel

1988-1992: Besuch der Grundschule in Tholey-Hasborn

1992-1998: Besuch der Kreisrealschule St.Wendel; Realschulabschluss am 10.07.1998

1998-2001: Besuch des Cusanus-Gymnasium in St.Wendel
Abitur am 07.06.2001 (Gesamtnote 1,0)

2001-2007: Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
- Physikum am 12.09.2003
- Praktisches Jahr am Universitätsklinikum des Saarlandes
Homburg/Saar vom 15.08.2006-15.07.2007
- Ärztliche Prüfung am 22.11.2007 (Gesamtnote sehr gut) und
Approbation als Arzt am 03.12.2007

2003-2007: Stipendium der Bischöflichen Studienförderung, Cusanuswerk

2004-2007: Promotion im Gastroenterologischen Forschungslabor der
Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes
(HNPCC-Arbeitsgruppe Professor Dr. Jochen Rädle)

Seit 2008: Assistenzarzt an der Klinik für Innere Medizin II Homburg/Saar
Direktor: Professor Dr. Frank Lammert

10/2008: Young Investigator Förderpreis der
Gastroenterologischen Arbeitsgemeinschaft Rheinland-Pfalz/Saarland