

Analyse von im Lynch-Syndrom identifizierten  
MLH1-Keimbahnmutationen  
auf molekulare und zelluläre Aspekte  
der DNA *Mismatch*-Reparatur

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
Inga Malena Hinrichsen  
Frankfurt, Januar 2012

Referent/in:

Prof. Dr. Frank Kempken

Korreferent/in:

Prof. Dr. Hinrich Schulenburg

Tag der mündlichen Prüfung:

26.03.2012

Zum Druck genehmigt: Kiel,

26.03.2012

Der Dekan

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Lynch-Syndrom	1
1.2	Mikrosatelliteninstabilität	3
1.3	Tumorentstehung im Lynch-Syndrom	4
1.4	<i>Mismatch</i> -Reparatur	6
1.4.1	Detektion von Fehlpaarungen	7
1.4.2	Initiierung der <i>Mismatch</i> -Reparatur und Strangunterscheidung	8
1.4.3	Reparatur von Fehlpaarungen	8
1.5	Die Struktur von MutL	12
1.6	Einordnung von Varianten	14
1.7	Problemstellung	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Material	19
2.1.1	Organismen	19
2.1.1.1	Bakterienstämme	19
2.1.1.2	Humane Zelllinien	19
2.1.1.3	Insektenzellen	19
2.1.2	Zugriffsnummern der verwendeten Sequenzen	20
2.1.3	Oligonukleotide	20
2.1.4	Plasmide	23
2.1.5	Chemikalien	26
2.1.6	Enzyme	27
2.1.7	Antikörper	27
2.1.8	Kits	28
2.1.9	DNA-Größenstandards	28
2.1.10	Protein-Größenstandards	28
2.1.11	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	28
2.1.12	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	29
2.1.13	Programme und Datenbanken	29

---

2.2	Methoden	30
2.2.1	Transformation in <i>E.coli</i>	30
2.2.2	Herstellung von kompetenten <i>E.coli</i> -Bakterien	30
2.2.3	Animpfen von Über-Nacht-Kulturen	31
2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	31
2.2.5	Einführen von Mutationen in Plasmide	31
2.2.6	Generierung von Bacmiden	32
2.2.7	Isolierung von Bacmid-DNA aus <i>E.coli</i>	32
2.2.8	PCR	33
2.2.9	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.2.10	Sequenz-PCR und Sequenzierung	33
2.2.11	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.12	Zellkultur	35
2.2.12.1	Bestimmung der Zellzahl	35
2.2.12.2	Kultivierung von <i>HEK293</i> - und <i>HEK293T</i> -Zellen	35
2.2.12.3	Einfrieren und Auftauen von <i>HEK293</i> - und <i>HEK293T</i> -Zellen	35
2.2.12.4	Transfektion $\text{CaCl}_2$	36
2.2.12.5	Transfektion mit PEI	36
2.2.12.6	Vereinzelung von Zellen für die Einzelzellfragmentanalyse	36
2.2.12.7	Kultivierung von <i>Sf9</i> -Zellen	37
2.2.12.8	Transfektion von <i>Sf9</i> -Zellen mit Bacmid-DNA	37
2.2.12.9	Amplifikation des Virus	37
2.2.12.10	Expression von Proteinen in <i>Sf9</i> -Zellen	38
2.2.13	Fluoreszenzmikroskopie	38
2.2.14	DNA-Extraktion aus <i>HEK293</i> - und <i>HEK293T</i> -Zellen	38
2.2.15	RNA-Isolierung aus <i>HEK293</i> - und <i>HEK293T</i> -Zellen	38
2.2.16	Isolierung von Proteinen	39
2.2.16.1	Isolierung von nativem Gesamtprotein aus <i>HEK</i> -Zellen	39
2.2.16.2	Kernextraktion aus <i>HEK</i> -Zellen	39
2.2.16.3	Nachweis der Expression des Zielproteins in <i>Sf9</i> -Zellen	41

---

2.2.16.4	Isolierung von nativem Protein aus <i>Sf9</i> -Zellen	42
2.2.16.5	Aufreinigung von Proteinen über den His-Tag	42
2.2.17	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	44
2.2.18	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	44
2.2.19	SDS-Gelelektrophorese	44
2.2.20	Proteindetektion	45
2.2.20.1	Western Blot	45
2.2.20.2	Detektion	46
2.2.21	Coomassiefärbung von SDS-Gelen	46
2.2.22	Autoradiographie	47
2.2.23	Native Protein-Gelelektrophorese mit Western Blot	47
2.2.24	Herstellung des MMR-Plasmids	48
2.2.25	MMR-Assay	49
2.2.26	<i>Thermal-Shift-Assay</i>	52
2.2.27	<i>Pulse-Chase-Assay</i> mit <i>in vitro</i> -Transkription und Translation	54
2.2.28	<i>In silico</i> -Stabilitätsanalyse	54
2.2.29	Vernetzungen von Proteinen im Lysat	57
2.2.30	Coimmunopräzipitation	57
2.2.31	Quantitative <i>real time</i> -PCR	58
2.2.32	Fragmentanalyse	59
2.2.33	Prüfung auf Signifikanz: T-Test	60
2.2.34	Sammeln klinischer Daten für ausgewählte MLH1-Varianten	60
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
3.1	Screening von MLH1-Varianten	61
3.1.1	Untersuchung der Proteinexpression	62
3.1.2	Analyse der Reparaturfähigkeit	66
3.1.3	Zusammenfassung des Screenings	69
3.2	Bildung des Heterodimers MutL $\alpha$	70
3.2.1	Untersuchung der C-terminalen Dimerisierung mit Varianten aus dem Screening	72

---

---

3.2.1.1	Experimentelle Untersuchung der Dimerisierungsfläche	73
3.2.1.2	Bioinformatische Analyse der Dimerisierungsfläche	78
3.3	Untersuchung der verminderten Expression von MLH1-Varianten	80
3.3.1	Ermittlung der gebildeten mRNA-Mengen	81
3.3.2	Bestimmung der Proteinstabilität	83
3.3.2.1	Ermittlung der Stabilität im <i>Thermal-Shift-Assay</i>	84
3.3.2.2	Bestimmung der Proteinstabilität <i>in vitro</i> durch den <i>Pulse-Chase-Assay</i>	87
3.3.3	<i>In silico</i> -Analyse	89
3.4	Bestätigung der Reparaturdefizienz von <i>HEK293T</i> -Zellen <i>in vivo</i>	94
3.5	Bestimmung der erforderlichen MLH1-Menge für eine ausreichende Reparatur	95
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
4.1	Im Screening wurden vier Gruppen von MLH1-Varianten detektiert	97
4.2	Die Dimerisierungsfläche wird von den außenliegenden Subdomänen gebildet	99
4.3	Die reduzierte MLH1-Expression beruht auf verminderter Proteinstabilität	102
4.4	Die verwendeten Algorithmen sagen die Pathogenität aufgrund von reduzierter Proteinstabilität nicht voraus	103
4.5	Im MMR-Assay sind 50 % des endogenen MLH1 für eine effektive Reparatur ausreichend	104
4.6	Die verminderte Expression korreliert mit dem Auftreten klinischer Effekte	104
4.7	Die Pathogenität aufgrund von verminderter Expression kann mit den „Grenz“-Varianten bewertet werden	111
4.8	Nicht klassifizierte Missense-Varianten sollten zuerst auf eine ausreichende Expression getestet werden	113
4.9	Ausblick	115
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>131</b>

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
C-terminal	carboxy terminal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom ( <i>Hereditary nonpolyposis colon cancer</i> )
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
kDa	kilo Dalton
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
N-terminal	amino terminal
NTPs	Ribonukleosidtriphosphate
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

---

Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Uracil
VUS	nicht-klassifizierte Varianten ( <i>variants of uncertain significance</i> )
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
XGal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-Galactopyranosid

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

Für Aminosäuren wurde der Einbuchstaben-Code verwendet:

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DAS LYNCH-SYNDROM

Kolonkarzinome zählen zu den häufigsten malignen (bösartigen) Erkrankungen. Sie sind jedes Jahr für 70.000 Neuerkrankungen und 30.000 Todesfälle in Deutschland verantwortlich (Schmiegel et al. 2008). Ein Teil der Erkrankungen beruht auf erblichen Formen des Darmkrebses. Das Lynch-Syndrom ist die häufigste Form des erblichen Darmkrebses und für 2-5 % der Kolonkarzinome verantwortlich (Lynch et al. 2009). Da die Erkrankung autosomal dominant vererbt wird, tritt sie innerhalb einer Familie gehäuft auf. Eine erbliche Prädisposition für Krebserkrankungen wurde erstmals 1913 von Aldred Scott Warthin systematisch nachgewiesen (Warthin 1913). Die Bezeichnung *Cancer Family Syndrome (CFS)* wurde etabliert. Später wurde die Erkrankung „erbliches nicht-polypöses kolorektales Karzinom“ (*Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC*) genannt, um es von der FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis) abzugrenzen, einer ebenfalls erblichen Erkrankung, bei der es zur massenhaften Bildung von Polypen im Kolon kommt. Mittlerweile wird der Ausdruck Lynch-Syndrom bevorzugt, da die Erkrankung neben dem Kolon auch noch andere Organe trifft, insbesondere das Endometrium. Die Bezeichnung Lynch-Syndrom geht auf Henry T. Lynch zurück, einen amerikanischen Internisten, der in den 1960er Jahren die erbliche Prädisposition für Krebs untersuchte (Lynch et al. 1966).

Die wichtigsten klinischen Merkmale des Lynch-Syndroms:

- erbliche Prädisposition für Krebs
- Neben Kolonkarzinomen erhöhte Inzidenz von Malignomen in anderen Organen: Endometrium, Ovar, Magen, Dünndarm, Leber und Gallengänge, Urothel, Gehirn
- früheres Durchschnittserkrankungsalter bei Kolonkarzinomen als bei sporadischen Kolonkarzinomen
- proximale (rechtsseitige) Lokalisation von Kolonkarzinomen
- beschleunigte Adenom-Karzinom-Sequenz
- bessere Prognose bei Kolonkarzinomen als bei sporadischem Kolonkarzinom
- erhöhtes Risiko für synchrone und metachrone Karzinome
- Kolonkarzinome häufig gering differenziert

(Lynch and de la Chapelle 2003; Jasperson et al. 2010; Lynch et al. 2009; Aarnio et al. 1999)

Das Lynch-Syndrom beruht auf einer heterozygot vorliegenden Keimbahnmutation in einem der *Mismatch*-Reparaturgene, die dazu führen, dass das *Mismatch*-Reparatursystem ausfällt. Die postreplikative DNA-*Mismatch*-Reparatur behebt Fehler, die der Polymerase während der Replikation unterlaufen, dazu gehören Basenfehlpaarungen (*Mismatches*) und Insertionen und Deletionen von wenigen Basen. Der Ausfall des Reparatursystems führt zur Anhäufung von Fehlern in der DNA, und so zur Tumorentstehung.

Für die Hauptproteinkomplexe in der *Mismatch*-Reparatur kodierenden in *E.coli* die *mutS*- und *mutL*-Gene. Das DNA-Reparatursystem war in *E.coli* beschrieben und bereits *in vitro* rekonstruiert worden (Modrich 1989, 1991; Lahue et al. 1989; Cooper et al. 1993; Su and Modrich 1986; Welsh et al. 1987), als es im Menschen entdeckt und mit dem Lynch-Syndrom im Zusammenhang gebracht wurde.

Beim Menschen wurden verschiedene *mutS*- und *mutL*-Homologe identifiziert. Lynch-Syndrom-Mutationen sind jedoch nur in *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* bekannt. Die Diagnose kann ausschließlich durch den Nachweis einer inaktivierenden Mutation in einem der vier *Mismatch*-Reparaturgene erfolgen. Den Hinweis auf eine Lynch-Syndrom-Erkrankung können die Amsterdam-Kriterien geben. Sie wurden 1990, noch bevor die molekulare Ursache bekannt war, zur Erkennung von Lynch-Syndrom-Familien zu Forschungszwecken entwickelt (Vasen et al. 1991). Bei den Amsterdam II-Kriterien von 1999 (Vasen et al. 1999) handelt es sich um eine Ausweitung der Kriterien von 1990 auf Tumore außerhalb des Kolons. Die Amsterdam-Kriterien weisen eine Sensitivität von 78 % und eine Spezifität von 61 % auf (Syngal et al. 2000).

Die Amsterdam-Kriterien:

- mindestens drei Verwandte sind am kolorektalen Karzinom erkrankt
- einer der betroffenen Patienten steht zu den anderen beiden in erstgradiger Verwandtschaftsbeziehung
- mindestens zwei Generationen sind betroffen
- bei mindestens einem Erkrankten wurde die Diagnose vor dem 50. Lebensjahr gestellt
- FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) wurde ausgeschlossen
- der Tumor wurde histologisch verifiziert

(Vasen et al. 1991)

## 1.2 MIKROSATELLITENINSTABILITÄT

Die Instabilität repetitiver DNA-Sequenzen ist charakteristisch für Lynch-Tumore. 90 % der Lynch-assoziierten Kolonkarzinome weisen Mikrosatelliteninstabilität (MSI) auf (Jasperson et al. 2010). Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet die Verkürzung oder Verlängerung der Mikrosatelliten, repetitiver DNA-Sequenzen, aufgrund von Insertions-Deletions-Schleifen (I-D-Schleifen: *insertion-deletions-loops IDLs*). In Insertions-Deletions-Schleifen ist der neusynthetisierte DNA-Strang länger oder kürzer als der Leitstrang, dadurch kommt es an diesen Stellen zur Schleifenbildung der DNA. Im Bereich repetitiver Sequenzen verfügt die Polymerase über die Neigung zum Verrutschen (*slippage*) (Jiricny 2006), da sich nur hier der neusynthetisierte Strang in einer falschen Position wieder an das Strangende anlagern kann. Je nachdem, ob der Folgestrang sich vor oder hinter der eigentlichen Position an den Leitstrang anlagert, wird der Folgestrang länger oder kürzer als der Leitstrang (Abbildung 1).

Normalerweise werden Replikationsfehler (kleine I-D-Schleifen und Basenfehlpaarungen) vom *Mismatch*-Reparatur-System korrigiert. Wenn dieses System jedoch ausgefallen ist, werden die Fehler konserviert und es kommt so zu Längenänderungen der Mikrosatelliten. Da die Mikrosatelliteninstabilität das auffälligste Anzeichen für ein ausgefallenes *Mismatch*-Reparatur-System ist, werden im Rahmen von Voruntersuchungen beim Verdacht auf das Lynch-Syndrom fünf international festgelegte Mikrosatelliten-Loci getestet (Boland et al. 1998). Wenn sich in zwei Fällen oder mehr die Länge des Mikrosatelliten im Tumor von dem im Normalgewebe unterscheidet, wird das Karzinom als MSI-positiv eingeordnet.

Zwar zeigen fast alle Lynch-Tumoren MSI, jedoch ist das Lynch-Syndrom bei weitem nicht der einzige Grund für das Entstehen einer MSI. Etwa 15 % aller Tumoren zeigen MSI (Bellizzi and Frankel 2009). Die MSI in den sporadischen Tumoren entsteht durch einen somatischen Ausfall des Reparatursystems, der häufig auf der Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors beruht (Kane et al. 1997). Somatische Mutationen des *BRAF*-Gens weisen auf die Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors hin. Eine besonders häufige Mutation in *BRAF* ist die Mutation, die in einem Aminosäurewechsel an der Position 600 resultiert (Loughrey et al. 2007). Deshalb werden Patienten heute auf diese Mutation untersucht. Der Nachweis dieser Mutation gilt als Ausschlusskriterium für das Lynch-Syndrom.

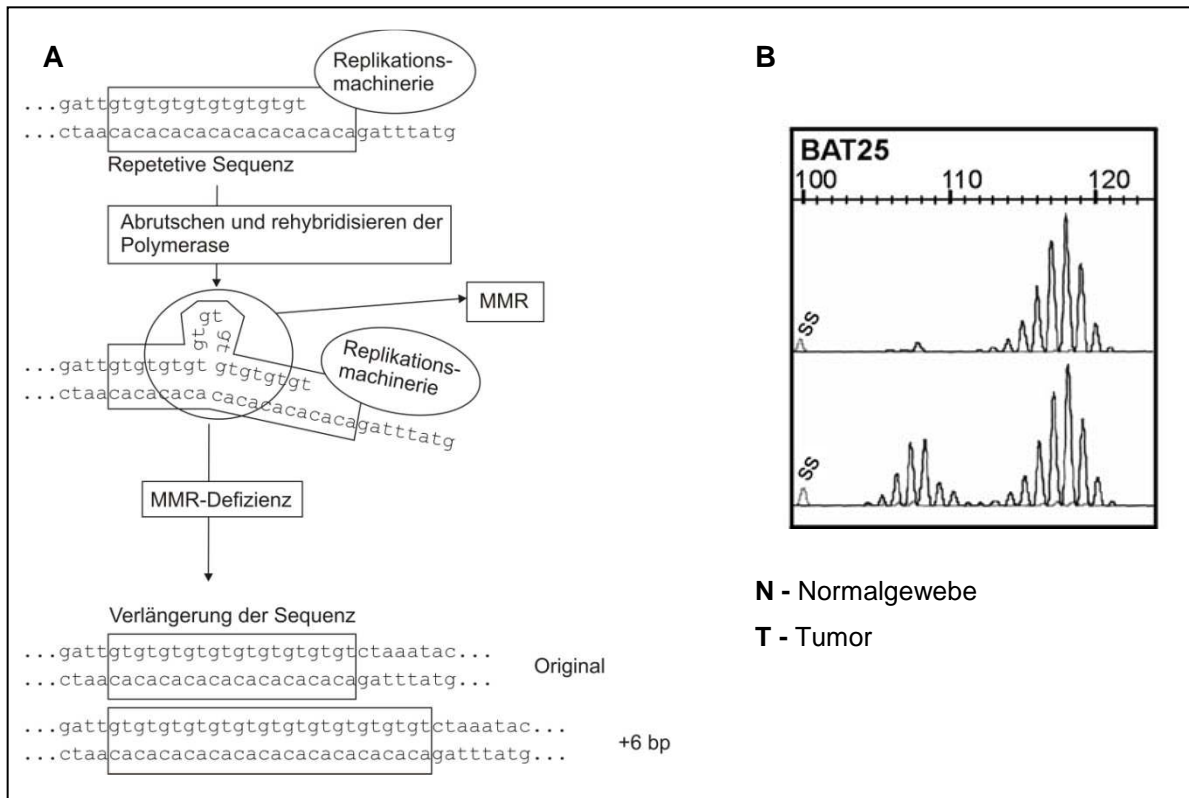


Abbildung 1: Mikrosatelliteninstabilität (MSI). In Sequenzen mit kurzen Wiederholungen (bis zu sechs Nukleotide), die auch Mikrosatelliten genannt werden, neigt die Polymerase zum Verrutschen. In **A** ist der Vorgang am Beispiel einer Wiederholung von 10 x GT gezeigt. Während des temporären Auseinanderfallens der Replikationsmaschinerie kommt es zur Ausformung kleiner Schleifen. Da das Ende des neusynthetisierten Strangs fehlerfrei hybridisieren kann, wird die Replikation nach dem Wiederaussetzen des Replikationsapparates fortgesetzt. Wenn die DNA-Schleife nicht durch die *Mismatch*-Reparatur (MMR) korrigiert wird, wird die Verlängerung der Sequenz in der nächsten Replikation konserviert. **B** Diagnose von MSI im Tumor. Während das untersuchte Fragment (hier BAT25) im Normalgewebe eine Länge von 118 bp aufweist, wurden im Tumor zwei unterschiedliche Fragmentlängen detektiert. Neben einem normallangen Allel wurde ein um 10 bp verkürztes Allel detektiert. Übernommen aus Plotz et al. (2006b).

### 1.3 TUMORENTSTEHUNG IM LYNCH-SYNDROM

Das Lynch-Syndrom wird durch eine heterozygot vorliegende Keimbahn-Mutation in einem der vier *Mismatch*-Reparatur-Gene *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* oder *MSH6* ausgelöst (Umar et al. 2004; Vasen et al. 1999; Rodriguez-Bigas et al. 1997). Wenn es zum somatischen Ausfall des zweiten, „gesunden“ Allels im Zielorgan kommt, fällt die *Mismatch*-Reparatur aus, Mutationen häufen sich an und ermöglichen die Tumorentstehung.

Tumorsuppressorgene sind Gene, die für Proteine kodieren, die eine Rolle in der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität, der Apoptose oder des Zellzyklus spielen

und so verhindern, dass ein Tumor entsteht. Normalerweise ist es für das Ausschalten von Tumorsuppressorgenen nötig, beide Allele durch Veränderung oder Deletion zu inaktivieren (Zwei-Treffer-Hypothese, (Knudson 1985)). Menschen, die eine Keimbahnmutation in einem Tumorsuppressorgen tragen, haben ein deutlich erhöhtes Risiko, an Krebs zu erkranken, da der „erste Treffer“ bereits erfolgt ist. Durch die Mutation ist ein Allel bereits inaktiviert und es muss nur noch das zweite Allel inaktiviert werden, um die Funktion des Gens auszuschalten. Neben dem Lynch-Syndrom sind das Li-Fraumeni-Syndrom (Ausfall von p53) oder die Brustkrebsprädisposition durch den Ausfall von BRCA1 und BRCA2 Beispiele für solche erblichen Prädispositionen.

Zur MSI kommt es sowohl in nicht kodierenden, als auch in kodierenden Bereichen (*cMS-coding microsatellites*). Das bekannteste Beispiel für MSI in einem kodierenden Bereich ist TGFBR2. Das *TGFB-Rezeptor 2*-Gen verfügt über ein A<sub>10</sub>-Repeat, der in über 90 % der MSI- Kolonkarzinome mutiert ist (Markowitz et al. 1995). Die Mutation zu einem A<sub>9</sub>-Repeat führt zu einer Leserahmenverschiebung und einem vorzeitigen Stopp-Codon. Das resultierende Protein ist nicht funktionsfähig, und so kommt es zu einem Abbruch des TGFBR2-vermitteltem Signalwegs (Akiyama et al. 1997). Inzwischen wurden viele weitere Gene gefunden, die häufig in mikrosatelliteninstabilen Tumoren mutiert sind, wie *BAX*, *BLM*, *Caspase-5*, *BCL-10*, *CHK1*, *APC*, *MSH3* und *MSH6* (Duval and Hamelin 2002). Diese Gene spielen eine tumorunterdrückende Rolle aufgrund von proapoptotischen Funktionen, Funktionen in der Zellzyklusregulation oder der Antwort auf DNA-Schäden der resultierenden Genprodukte. Die Instabilität codierender Mikrosatelliten wurde daher als Schlüsselmechanismus der Tumorentstehung identifiziert (Mori et al. 2001; Kloor et al. 2010).

Neben dem autosomal-dominanten Lynch-Syndrom treten auch biallelische Mutationen der *Mismatch*-Reparatur-Gene auf. Außer homozygoten Mutationen wurden auch Fälle beschrieben, wo die Allele unterschiedliche pathogene Mutationen tragen. Diese Genotypen verursachen CMMR-D (*constitutional MMR-Deficiency*). Patienten weisen neben den Lynch-Syndrom-Tumoren außerdem häufig Hirntumore und hämatologische Erkrankungen auf (Wimmer and Kratz 2010).

Abgesehen von der Reparatur von DNA-Fehlern nach der Replikation sind die *Mismatch*-Reparatur-Proteine an der Erkennung oder Reparatur verschiedenster anderer DNA-Schäden beteiligt und interagieren mit Proteinen, die in der Auslösung von Zellzyklusarrest oder Apoptose eine Rolle spielen. Mit dem Ausfall des MMR-Systems fallen auch einige Apoptosewege aus, dies hat nicht nur Einfluss auf die Tumorentstehung, sondern auch auf die Behandlung von Lynch-Syndrom-Patienten. Viele Chemotherapeutika wirken durch das Auslösen von Apoptose. Der Verlust der *Mismatch*-Reparatur führt häufig zu Resistenzen gegen diese Medikamente. Zellen, die MMR-

defizient sind, sind resistent gegenüber methylierenden Substanzen, Cisplatin und UV-Strahlung (Fink et al. 1998).

#### 1.4 MISMATCH-REPARATUR

Im menschlichen Körper erfolgen etwa 10 Millionen Zellteilungen pro Sekunde (Marnett and Plastaras 2001) und jedes Mal wird das über 3 Milliarden bp lange Genom dupliziert. Die Fehlerrate liegt bei lediglich einem Fehler pro zehn Milliarden replizierter Basen (Umar and Kunkel 1996). Um diese geringe Fehlerrate zu erreichen, wird der Replikationsprozess überwacht und Fehler werden gegebenenfalls korrigiert. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Polymerase eine falsche Base einbaut, liegt bei 1:100000. Dadurch, dass die humanen Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$ , die für die Elongation während der Replikation zuständig sind, über eine Korrekturlesefunktion (*proof-reading*) und eine 3'→5'-Exonuklease verfügen, wird die Fehlerquote um das 10- bis 1000-fache reduziert. Die postreplikative Reparatur bewirkt eine weitere Verringerung der Fehlerquote um das bis zu 1000-fache (Umar and Kunkel 1996).

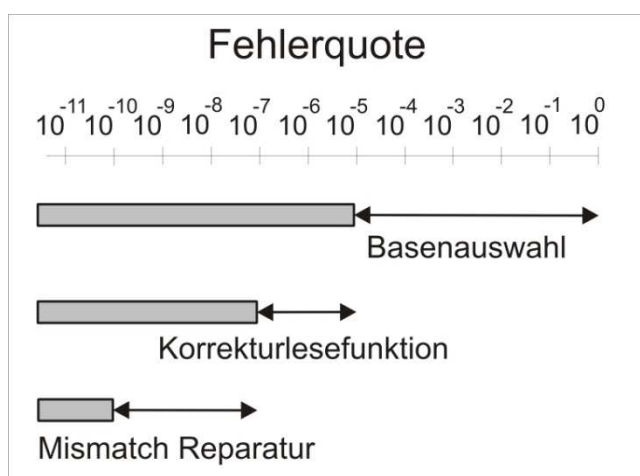


Abbildung 2: Reduzierung der Fehlerquote in der Replikation. Die Polymerase weist eine Fehlerrate von  $1:10^5$  auf. Durch die intrinsische Korrekturlesefunktion der Polymerasen Pol $\delta$  und Pol $\epsilon$  und die postreplikative *Mismatch*-Reparatur kann die Replikationstreue erheblich verbessert werden und es kommt nur noch zu einem Fehler auf  $10^{10}$  eingebaute Basen. Übernommen aus: (Umar and Kunkel 1996).

Die *Mismatch*-Reparatur behebt postreplikativ Fehler der Polymerase, wie Basenfehlpaarungen oder kleine I-D-Schleifen. Der Reparaturverlauf gliedert sich in die Erkennung des Fehlers, die Hydrolyse des fehlerhaften Strangs, die Neusynthese des entfernten Stranges und schließlich die Ligation. Die Hauptkomplexe der *Mismatch*-

Reparatur sind MutS und MutL. Während MutS die Fehler in der DNA erkennt, koordiniert MutL die beteiligten Proteine. Der Ablauf ist im Detail in den folgenden Kapiteln beschrieben, eine detaillierte Darstellung ist in Abbildung 4 gezeigt.

#### 1.4.1 DETEKTION VON FEHLPAARUNGEN

Die Erkennung von DNA-Fehlpaarungen, die von der Polymerase verursacht wurden, erfolgt durch ein MutS-Protein. Im humanen System erkennen verschiedene MutS-Heterodimere verschiedene Fehler mit unterschiedlicher Affinität: MutS $\alpha$ , bestehend aus MSH2 und MSH6, verfügt über eine höhere Affinität zu Fehlpaarungen, während MutS $\beta$ , bestehend aus MSH2 und MSH3, I-D-Schleifen bis zu 8 bp Länge besser erkennt (Genschel et al. 1998; Dufner et al. 2000).

Im Prinzip können alle auftretenden Fehlpaarungen erkannt werden, jedoch mit unterschiedlicher Effizienz. MutS bindet am besten einen an G-T-*Mismatch*, an eine C-C-Fehlpaarung jedoch am schlechtesten (Kramer et al. 1984; Modrich and Lahue 1996).

In der ADP-gebundenen Form kann MutS $\alpha$  einen stabilen Komplex mit der DNA-Fehlpaarung bilden, MutS $\alpha$  bildet eine Klammer um die DNA und die DNA wird um etwa 60° knickt (Lamers et al. 2000; Obmolova et al. 2000). Durch die Bindung an die DNA mit dem *Mismatch* kommt es zu einer Konformationsänderung (Gradia et al. 1997), und durch den Austausch von ADP gegen ATP kann MutS $\alpha$  an der DNA entlang gleiten (Iaccarino et al. 2000). Dabei ist nicht klar, ob MutS $\alpha$  als *sliding-clamp* die DNA entlang diffundiert, oder ob eine Translokation durch mehrere Zyklen der ATP-Hydrolyse erfolgt (Jiricny 2006).

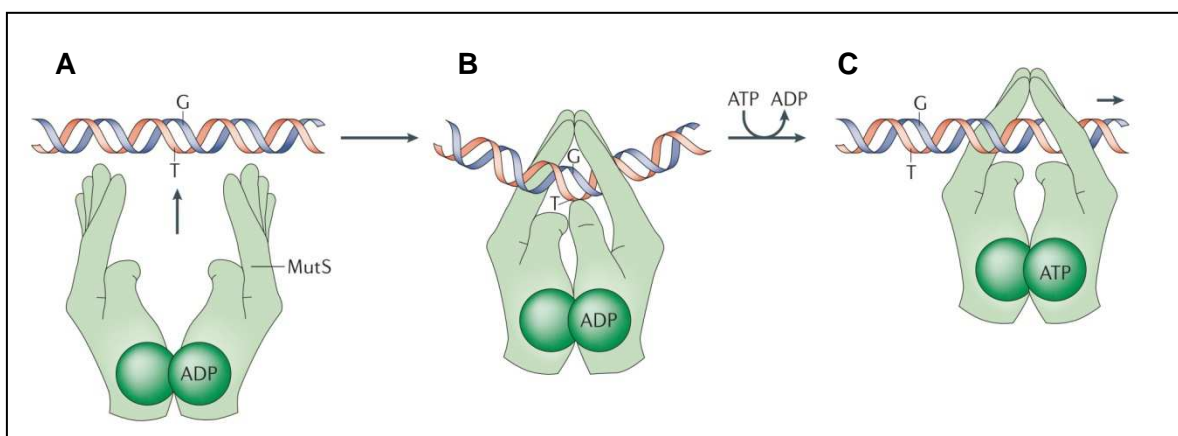


Abbildung 3: Detektion des DNA-Fehlers durch MutS (Modell der „betenden Hände“) **A** Wenn MutS nicht an DNA gebunden ist, die die Struktur offen und nur an den ATPase-Domänen dimerisiert. **B** Das ADP gebundene MutS bildet einen stabilen Komplex mit dem *Mismatch* und umschließt diesen wie „betende Hände“, es kommt zur spezifischen Interaktion zwischen MutS und dem *Mismatch*. **C** Durch den Austausch von ADP gegen ATP ändert MutS seine Konformation und kann nun auf der DNA entlang gleiten. Übernommen aus Jiricny et al. (2006).

#### 1.4.2 INITIIERUNG DER *MISMATCH*-REPARATUR UND STRANGUNTERSCHIEDUNG

Nach der Bindung der Fehlpaarung interagiert MutS zunächst mit MutL. Während Bakterien über ein Homodimer verfügen, ist in Eukaryoten ein Heterodimer aktiv. Im humanen System wird MutL $\alpha$  aus MLH1 und PMS2 gebildet. Mit der Bindung von MutL beginnt die Rekrutierung verschiedener Interaktionspartner, die für die Reparatur benötigt werden. Genau wie MutL ist beim Menschen vermutlich PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) an der Initiierung der Reparatur beteiligt. Das Homotrimer wird von RFC (*replication factor C*) auf die DNA geladen und bildet einen Ring. Sowohl MSH3 als auch MSH6, die jeweils mit MSH2 die verschiedenen humanen MutS-Komplexe bilden, haben PCNA-Bindestellen, und für beide konnte die Interaktion mit PCNA gezeigt werden (Umar et al. 1996; Flores-Rozas et al. 2000; Kleczkowska et al. 2001).

Für die Reparatur von Fehlpaarungen im Sinne der Vermeidung von Mutationen ist es essentiell, dass der „falsche“, neusynthetisierte Strang korrigiert wird. In *E.coli* ist der Mechanismus der Strangunterscheidung bekannt, hier dienen noch nicht methylierte GATC-Sequenzen im neusynthetisierten Strang als Unterscheidungsmerkmal. Die Endonuklease MutH bindet so an die hemimethylierten Sequenzen, dass der nichtmethylierte Strang geschnitten wird (Welsh et al. 1987).

Für Extrakte humaner Zellen dient *in vitro* ein Einzelstrangbruch im zu reparierenden Strang als Unterscheidungssignal, wobei dieser sowohl 3' als auch 5' von der Fehlpaarung liegen kann und hunderte von Basenpaaren entfernt sein kann (Fang and Modrich 1993). *In vivo* dienen beim Menschen vermutlich freie DNA-Enden, wie sie durch Okazaki-Fragmente (Folgestrang) und das Replikationsende (Leitstrang und Folgestrang) vorhanden sind, der Strangunterscheidung (Kunz et al. 2009).

#### 1.4.3 REPARATUR VON FEHLPAARUNGEN

Wie die Überbrückung der Distanz zwischen der Fehlpaarung und dem Einzelstrangbruch, der als Unterscheidungssignal dient, funktioniert, ist unklar. Im Wesentlichen gibt es drei Modelle für die Übermittlung des Signals zwischen Fehlpaarung und Strangunterscheidungssignal. Das „stationäre Modell“ geht davon aus, dass die DNA eine Schleife bildet und so die beiden Positionen zusammenbringt. In den beiden anderen Modellen verlässt MutS die Fehlpaarung und bewegt sich auf der DNA entlang. Im „Translokationsmodell“ erfolgt die Bewegung auf der DNA unter ATP-Verbrauch und die DNA bildet eine Schlaufe, während im „*Sliding clamp*-Modell“ MutS ATP gebunden hat,



jedoch nicht hydrolysiert und auf der DNA entlang gleitet, ohne dass die DNA eine Schlaufe bildet (zusammengefasst in Li (2008)).

Die Hydrolyse des fehlerhaften Strangs erfolgt im humanen System durch EXOI. EXOI ist eine Exonuklease, die DNA in 5'→3' Richtung hydrolysiert. Sie wird durch Komplexbildung mit MutS und unter der Voraussetzung, dass eine Fehlpaarung vorhanden ist, aktiviert (Schmutte et al. 2001; Genschel et al. 2002).

Das Heterodimer MutL $\alpha$  verfügt über eine Endonukleasefunktion, die das Einschneiden der DNA ermöglicht und so den Ansatz für die Reparatur schafft. Der Einzelstrangsnchnitt erfolgt in dem Strang, der bereits freie DNA-Enden aufweist. Dieser Mechanismus ist abhängig von MutS, PCNA und RFC (Kadyrov et al. 2006). MutL $\alpha$  ist nicht unbedingt erforderlich für die Reparatur, wenn der Einzelstrangbruch 5' von der Fehlpaarung liegt, da der Verdau des fehlerhaften Strangs durch die 5'→3' Exonuklease I ohne die Endonuklease-Aktivität von MutL $\alpha$  erfolgen kann. Liegt der Einzelstrangbruch 3' von der Fehlpaarung, was postreplikativ auf dem Leitstrang der Fall ist, ist MutL $\alpha$  essentiell, da mit der Endonukleaseaktivität der Einzelstrangbruch nach 5' verlegt wird und nur so die Hydrolyse in 5'→3' Richtung durch EXOI erfolgen kann. An der Reparatur von größeren I-D-Schleifen könnten andere Exonucleasen beteiligt sein. Die Stammzellextrakte von *Exo1*<sup>-/-</sup> Mäusen sind defizient in der Reparatur von Basenfehlpaarungen und kleiner I-D-Schleifen, nicht jedoch in der Reparatur größerer I-D-Schleifen (Wei et al. 2003).

EXOI wird durch RPA, MutL $\alpha$  und MutS $\alpha$  inhibiert, wenn keine Fehlpaarung mehr vorhanden ist (Zhang et al. 2005; Genschel and Modrich 2003). Die einzelsträngige DNA, die durch die Hydrolyse des zweiten Stranges entsteht, wird durch RPA gebunden. Die Bindung von RPA scheint neben der Termination der Exonucleasereaktion dem Schutz der Einzelstrang-DNA und der Förderung der Resynthese durch Pol $\delta$  zu dienen (Dzantiev et al. 2004; Zhang et al. 2005). Die Neusynthese des abgebauten Stranges erfolgt durch die Polymerase  $\delta$  (Longley et al. 1997), deren Aktivität wiederum von PCNA gefördert wird (Gu et al. 1998; Tsurimoto 1999).

Die Reparaturreaktion endet mit dem Verschließen des reparierten Stranges durch die DNA-Ligase 1. Weiterhin wurde eine Mitwirkung von HMGB1 an der Reparatur nachgewiesen, welches eine Affinität zu Unregelmäßigkeiten in der DNA aufweist, die Aktivität von EXOI beeinflusst und mit MLH1 interagiert (Yuan et al. 2004; Lange and Vasquez 2009).

Neben den humanen MutS-Homologen MutS $\alpha$  und MutS $\beta$  gibt es außerdem das MutS-Homolog MutS $\gamma$  (MSH4 + MSH5), dessen Beteiligung an der *Mismatch*-Reparatur bislang nicht gezeigt wurde. Außer dem humanen MutL-Homolog MutL $\alpha$  sind die MutL-Homologe MutL $\beta$  (MLH1 + PMS1) und MutL $\gamma$  (MLH1 + MLH3) bekannt. Für MutL $\gamma$  wurde gezeigt, dass das Dimer in der *Mismatch*-Reparatur aktiv ist, wenn auch nur in hoher

Konzentration und mit geringer Effizienz (Cannavo et al. 2005). Ebenfalls wurde gezeigt, dass *Mlh3*-Knockout-Mäuse kürzer leben und ein erhöhtes Krebsrisiko aufweisen. Außerdem zeigen *Pms2*<sup>-/-</sup>*Mlh3*<sup>-/-</sup> Mäuse eine ebenso verkürzte Lebensspanne wie *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäuse, was wiederum auf eine funktionelle Redundanz der MLH1-Bindungspartner hinweisen könnte (Chen et al. 2005). Die Funktion von MutL $\beta$  (MLH1 + PMS1) ist gänzlich unbekannt.

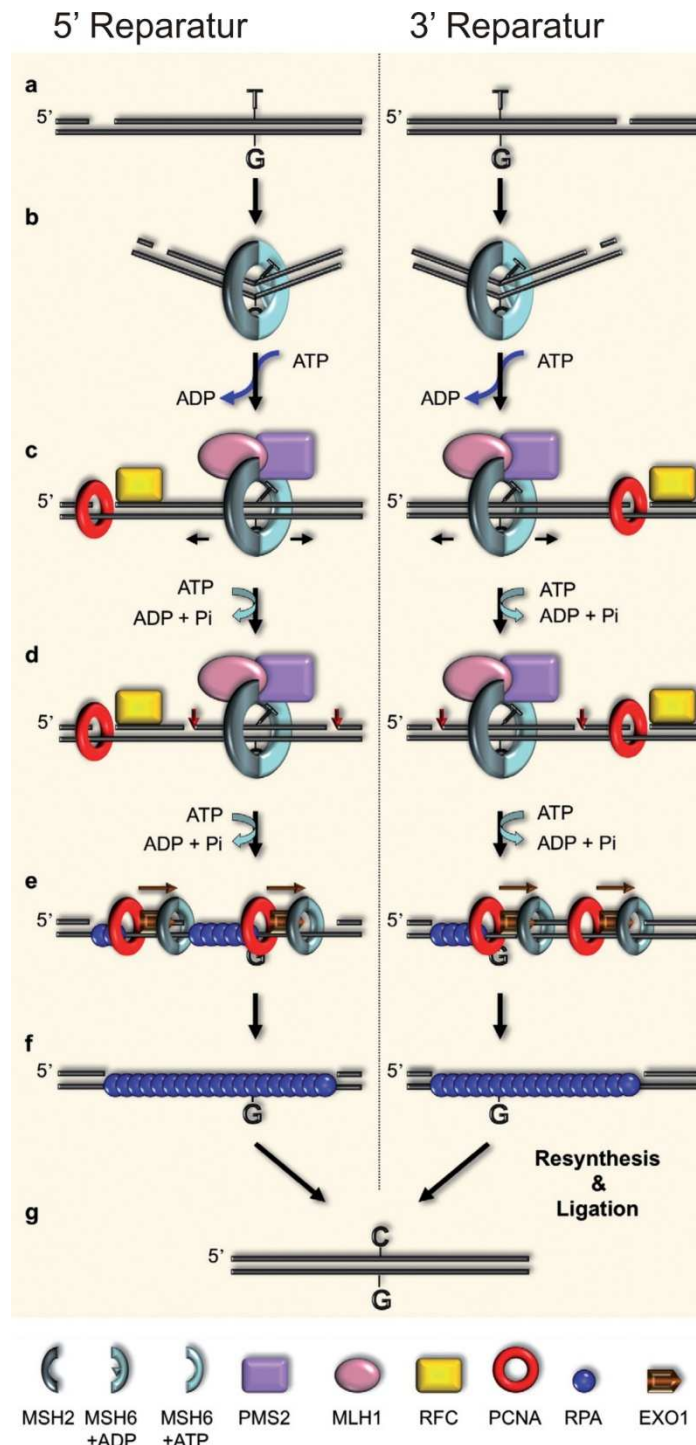


Abbildung 4: Ablauf der *Mismatch*-Reparatur. Links ist der Ablauf der Reparatur gezeigt, wenn das Strangunterscheidungssignal 5' von der Fehlpaarung liegt, rechts, wenn es 3' davon liegt (a). MutSα, bestehend aus MSH2 und MSH6, bindet an die Fehlpaarung (b), das gebundene ADP wird gegen ATP ausgetauscht, es kommt zu einer Konformationsänderung und zur Rekrutierung von MutLα (c). MutLα führt weitere Einzelstrangbrüche in den zu reparierenden Strang ein (rote Pfeile) (d). Dieser Prozess ist abhängig von der Anwesenheit von MutSα, RFC, PCNA und der Verfügbarkeit von ATP. Die Einzelstrangbrüche stellen den Startpunkt der Exonuklease EXO1 dar, die den fehlerhaften Strang in 5'→3' Richtung abbaut (e). Der entstehende Einzelstrang wird von RPA geschützt (f). Polδ synthetisiert den neuen Strang mit Hilfe der Kofaktoren PCNA und RFC. Die Reparatur wird durch die Ligation des neu synthetisierten Stranges durch Ligase 1 abgeschlossen (g). Übernommen aus Kunz et al. (2009).

## 1.5 DIE STRUKTUR VON MUTL

Während Bakterien MutL-Homodimere nutzen, erfolgt in Eukaryoten die Bildung von Heterodimeren (Abbildung 5). Im humanen System sind drei unterschiedliche MutL-Heterodimere bekannt, in denen jeweils MLH1 und ein weiteres Protein vorliegen: MutL $\alpha$ , bestehend aus MLH1 und PMS2, MutL $\beta$  aus MLH1 und PMS1 und MutL $\gamma$  aus MLH1 und MLH3. Während die Rolle von MutL $\beta$  ungeklärt ist, scheint MutL $\gamma$  an der *Mismatch*-Reparatur (Chen et al. 2005; Cannavo et al. 2005), sowie an der Meiose beteiligt zu sein (Kolas et al. 2005).

Die MutL-Proteine weisen zwei Domänen auf, die über eine flexible Linkerregion verbunden sind. Der N-Terminus enthält eine GHKL-ATPase (Dutta and Inouye 2000; Ban et al. 1999). Die GHKL-ATPasen sind nach den Mitgliedern der Familie benannt: Gyrasen, heat shock protein 90 (Hsp 90), bakterielle Histidin- und mitochondriale Serin-Kinasen und MutL. Für die *Mismatch*-Reparatur ist die ATPase-Aktivität essentiell (Hall et al. 2002; Pang et al. 1997; Spampinato and Modrich 2000; Raschle et al. 2002) und auch die Endonukleaseaktivität, die für das humane MutL $\alpha$  beschrieben wurde, ist abhängig von der ATPase-Funktion (Kadyrov et al. 2006).

Für die N-Termini wurde eine transiente Dimerisierung beschrieben (Ban et al. 1999; Ban and Yang 1998), die konstitutive Dimerisierung jedoch erfolgt über den C-Terminus (Guerrette et al. 1999; Plotz et al. 2003; Kosinski et al. 2005). Im Heterodimer kommt der Dimerisierung eine besondere Bedeutung zu, da PMS2 in Abwesenheit von MLH1 instabil ist (Chang et al. 2000). Das für hPMS2 beschreibende Endonuklease-Motiv liegt ebenfalls im C-Terminus (Kadyrov et al. 2006).

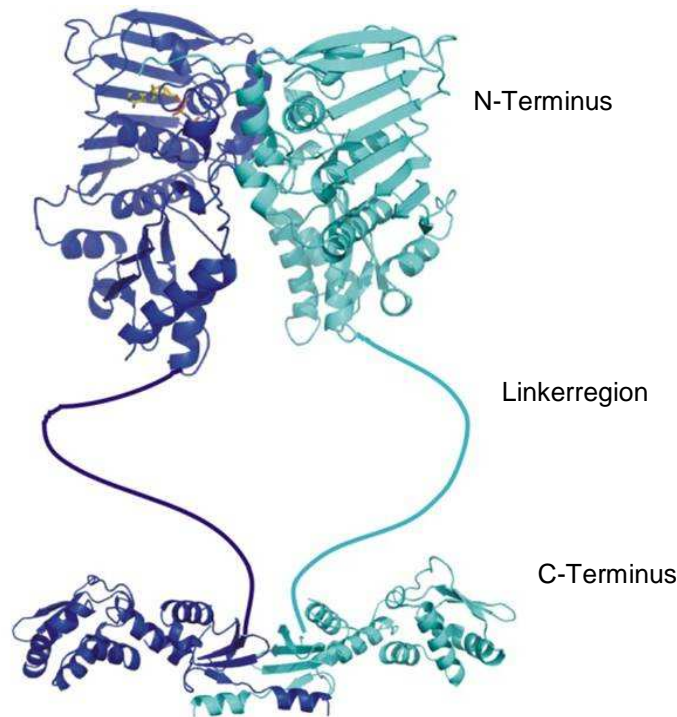


Abbildung 5: Struktur von MutL $\alpha$ . PMS2 ist in blau dargestellt, MLH1 in grün. Für den N-Terminus von PMS2 gibt es eine Kristallstruktur (Guarne et al. 2001), der N-Terminus von MLH1 ist ein Homologiemodell beruhend auf MutL aus *E.coli* (Plotz et al. 2006a). Die Struktur des C-Terminus von MutL $\alpha$  ist nicht bekannt, wurde jedoch auf Grundlage der Kristallstruktur von MutL aus *E.coli* modelliert (Kosinski et al. 2008). Die Struktur der Linkerregionen ist nicht bekannt und wird als flexibel beschrieben. Der N-Terminus enthält sowohl in MLH1 als auch in PMS2 die ATPase, die dauerhafte Dimerisierung erfolgt über den C-Terminus.

Für MutL $\alpha$  wird eine Koordinatorfunktion in der *Mismatch*-Reparatur vermutet, da es mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen interagiert (Polosina and Cupples 2010). In der *Mismatch*-Reparatur ist die Interaktion mit MutS $\alpha$  (Plotz et al. 2006a), EXO1 (Dherin et al. 2009; Tran et al. 2001), PCNA (Umar et al. 1996; Iyer et al. 2008), und MRE11 (Zhao et al. 2008) beschrieben. Für MRE11 wurde beschrieben, dass eine Inaktivierung zu MSI und eingeschränkter Reparatur führt (Vo et al. 2005).

Die Konformation von MutL $\alpha$  ändert sich durch ATP-Bindung und/oder Hydrolyse (Sacho et al. 2008), was dann die Interaktion mit unterschiedlichen Partnern verursachen könnte (Guarne et al. 2001; Raschle et al. 2002; Tran and Liskay 2000). In Abbildung 6 ist eine Darstellung unterschiedlicher Konformationen gezeigt. Es wird vermutet, dass MutL $\alpha$  *in vivo* mit MutS $\alpha$  und PCNA in komprimierter Form interagiert und nach Hydrolyse von ATP zu anderen Funktionen übergeht (Sacho et al. 2008).

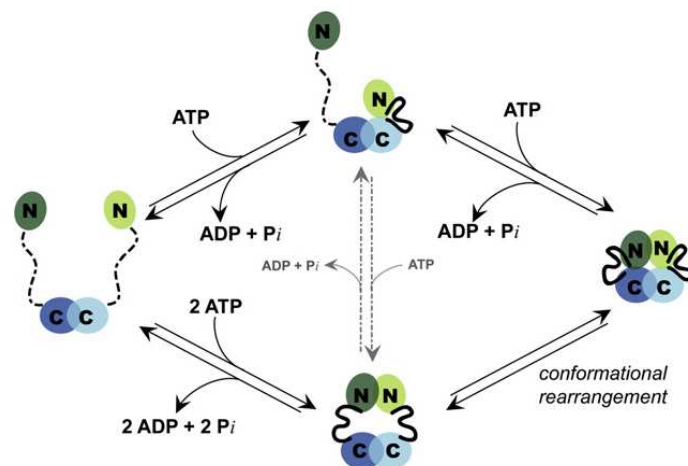


Abbildung 6: Unterschiedliche Konformationen von MutLα. MutLα kann in verschiedenen Konformationen vorliegen: beide Proteine liegen ausgestreckt vor, „einarmig“ (ein Protein ist zusammengezogen, das andere ausgestreckt), komprimiert (In beiden Proteinen liegen N- und C-Terminus dicht zusammen) oder teilkomprimiert (die Linker beider Proteine weisen eine mittlere Länge auf). Übernommen aus Sacho et al. (2008).

Außerdem scheint MutLα auch eine Rolle außerhalb der *Mismatch*-Reparatur zu spielen, z.B. in der Apoptose oder im Zellzyklusarrest, und dort weitere Interaktionspartner zu haben. Auch hier könnten die unterschiedlichen Konformationen von MutL eine Rolle spielen. Beispielsweise wurde für MLH1 die Interaktion mit c-Abl (eine Tyrosinkinase) beschrieben, die eine Rolle in der Antwort auf methylierende Substanzen spielt (Kim et al. 2007) und die Bindung an c-Myc, das über Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Apoptose regulierend wirkt (Mac Partlin et al. 2003). Auch interagiert MutLα mit FANCI, einer Helikase, die an der Antwort auf DNA-Quervernetzungen beteiligt ist. Die Bildung eines FANCI/MutLα-Komplexes scheint für das Verlassen eines eingetretenen Zellzyklusarrestes nötig zu sein (Peng et al. 2007).

## 1.6 EINORDNUNG VON VARIANTEN

Die Diagnose Lynch-Syndrom kann nur durch den Nachweis einer inaktivierenden Keimbahnmutation in einem der *Mismatch*-Reparaturgene *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* oder *MSH6* gestellt werden. Die Diagnose aufgrund klinischer Parameter ist nicht möglich. Die eindeutige Diagnose ist wichtig, da die Angehörigen der Patienten dann auf die entsprechende Keimbahnmutation getestet werden können. Angehörige, bei denen die Mutation nicht nachgewiesen wurde, werden so entlastet. Träger der inaktivierenden

Mutation erhalten Zugang zu entsprechend engmaschiger Vorsorge. Diese senkt das Auftreten von Kolonkarzinomen und wirkt lebensverlängernd (Stupart et al. 2009).

Mutationen, die zu frühen Stoppcodons, Leserasterverschiebungen oder Veränderung der Spleißstellen führen, lassen sich als krankheitsauslösend einordnen. Der Einfluss von kleinen Insertionen oder Deletionen, die keine Leserasterverschiebung bewirken, oder Missense-Varianten, die den Austausch einer Aminosäure gegen eine andere zur Folge haben, lässt sich hingegen nicht vorhersagen.

Die Beurteilung der Pathogenität kann in diesen Fällen durch die Auswertung klinischer Daten („direct evidence“) erfolgen, wie der Kosegregation von Variante und Krankheit oder durch Fall-Kontroll-Analysen. Für die meisten Varianten sind jedoch nicht genügend solcher Daten verfügbar. Die Einschätzung der Pathogenität kann auch durch experimentelle Daten erfolgen („indirect evidence“). Die meisten Assays jedoch testen nur eine oder einige der Funktionen, die das Zielprotein oder die Zielproteine wahrnehmen, außerdem ist das Ergebnis eines Experiments in der Regel nicht absolut, sondern abgestuft. Dies wiederum führt zu der Frage, wie stark ein Effekt sein kann, ohne die Proteinfunktion zu beeinflussen bzw. ab welcher Einschränkung die Krankheit tatsächlich ausgelöst wird.

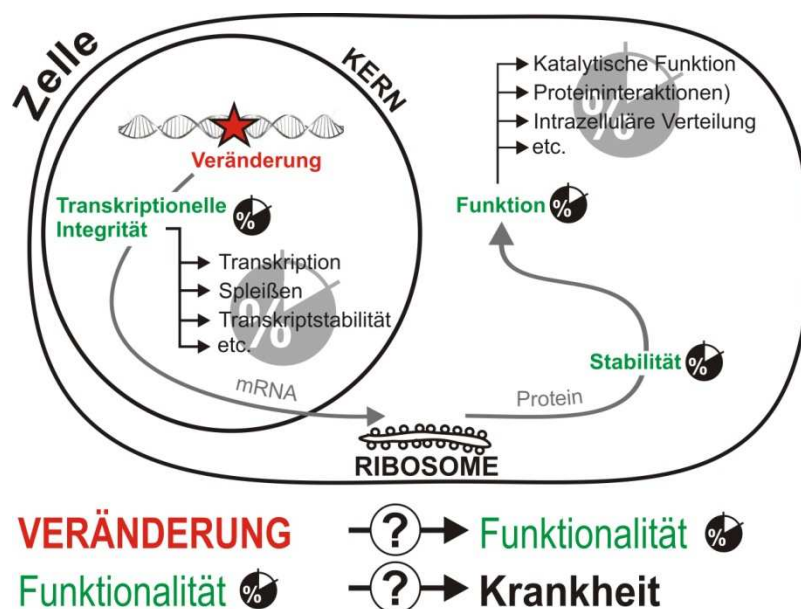


Abbildung 7: Auswirkungen von genetischen Veränderungen auf die Funktionalität des Proteins und die Ausprägung des Krankheitsbildes. Veränderungen des Gens können Auswirkungen auf die transkriptionelle Integrität oder auf die Proteinstabilität und –funktion haben. Alle Effekte können unterschiedliche Ausprägungen zwischen der normalen Höhe und dem kompletten Verlust annehmen. Die Veränderung hat Auswirkungen auf die Funktionalität des Gens. Die graduellen Effekte auf die Funktionalität führen zur Ausbildung des Krankheitsbildes, sind also pathogen, wenn der Defekt der Funktionalität schwer genug wiegt. Die ausreichende oder nichtausreichende Funktionalität muss ermittelt werden, um die Bewertung der Pathogenität zu ermöglichen.

In Abbildung 7 ist dargestellt, wie eine Veränderung in einem proteinkodierenden Gen die Funktionalität des Genproduktes beeinflussen kann. Die Veränderung kann Einfluss auf das Transkript haben, z.B. über die Veränderung oder Unterbindung des Spleißens, die Transkriptstabilität oder die Transkription insgesamt, wenn z.B. die Veränderung die Affinität eines Transkriptionsfaktors verändert. Eine Veränderung kann jedoch, wenn sie die Bildung eines veränderten Proteins erzeugt, auch die Proteinstabilität oder die Proteinfunktion beeinträchtigen. Der Effekt auf jedes der Parameter kann graduell ausgeprägt sein, und je nachdem, wie stark der Effekt ausgeprägt ist, kommt es zur Ausbildung des Krankheitsbildes. Um die Pathogenität einer Variante zu beurteilen, muss validiert werden, wie stark der Effekt auf die Funktionalität sein muss, um zur Pathogenität zu führen.

Bei der Untersuchung von nichtklassifizierten Varianten ist es außerdem interessant, welche der Parameter am wahrscheinlichsten die Ursache für eine Pathogenität darstellen. Bei Missense-Varianten, also Punktmutationen in der kodierenden Sequenz, sind Auswirkungen auf die transkriptionelle Integrität unwahrscheinlich, so lange nicht eine Spleißstelle betroffen ist. Auswirkungen auf die Stabilität des Proteins sowie die Proteinfunktion sind wahrscheinlicher.

Dadurch, dass DNA-Sequenzierungen immer schneller und billiger werden, ist zu erwarten, dass in der Zukunft viele weitere Missense-Varianten und kleine Deletionen und Insertionen identifiziert werden. Deshalb wird eine Strategie benötigt, wie mit diesen nicht klassifizierten Varianten (*VUS, variants of uncertain significance*) umgegangen wird (Tavtigian et al. 2008).

2008 wurde von der IARC, der internationalen Agentur für Krebsforschung (*International Agency for Research on Cancer*), einer Einrichtung der WHO, eine Arbeitsgruppe für nichtklassifizierte Varianten von Hochrisiko-Krebs-Predispositionsgenen (*Unclassified Sequence Variants in high-risk cancer susceptibility genes*) ins Leben gerufen. Diese Arbeitsgruppe fordert eine Bewertung von verschiedenen Parametern, die zur Klassifizierung verwendet werden können (Goldgar et al. 2008; Tavtigian et al. 2008).

## 1.7 PROBLEMSTELLUNG

Das Lynch-Syndrom, eine Prädisposition für Kolonkarzinome und andere Tumorerkrankungen, wird durch eine inaktivierende Mutation in einem Allel eines der *Mismatch*-Reparaturgene *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* oder *MSH6* hervorgerufen. Die Genprodukte dieser vier Gene bilden die beiden Hauptkomplexe in der *Mismatch*-Reparatur, der Reparatur von Basenfehlpaarungen und kleinen DNA-Schleifen während



der Replikation. Der somatische Ausfall des gesunden Allels führt zur Reparatur-Defizienz und somit zur Tumorentstehung.

Die meisten Veränderungen wurden in *MLH1* detektiert (Peltomaki and Vasen 2004). Etwa ein Drittel dieser Veränderungen sind Missense-Veränderungen (Nystrom-Lahti et al. 2002). Diese Varianten gelten als VUS, als Varianten mit unsicherer Pathogenität (*variant of uncertain significance*). Wird eine solche Veränderung detektiert, ist die Diagnose Lynch-Syndrom nicht möglich, und damit erhalten betroffene Verwandte des Patienten weder Beratung, noch Zugang zu genetischen Tests und Vorsorgeuntersuchungen.

Eine große Anzahl *MLH1*-Varianten sollte analysiert werden und die experimentellen Ergebnisse sollten mit klinischen Daten validiert werden, um so eine Beurteilung der Pathogenität durch Experimente zu ermöglichen.

Zunächst sollte ein Screening von *MLH1*-Missense-Varianten durchgeführt werden. Es wurden zwei Parameter gewählt, bei denen die wesentlichen Eigenschaften quantifiziert werden. Erst sollte die *MLH1*-Expression der Varianten untersucht werden, da die Verfügbarkeit des Proteins ein Schlüsselproblem zu sein scheint. In vorangegangenen Studien wurde häufig eine geringe Expression detektiert (Raevaara et al. 2005; Takahashi et al. 2007; Hardt et al. 2011). Außerdem sollte die generelle Reparaturfähigkeit getestet werden. Da die Defizienz der *Mismatch*-Reparatur als Grundlage des Lynch-Syndroms anerkannt ist, ermöglicht ein Assay, der die Reparaturfähigkeit testet, die Beurteilung von Varianten im Hinblick auf die klinische Relevanz (Goldgar et al. 2008).

Auf Grundlage des Screening sollten anschließend Varianten gewählt werden, um die molekularen Konsequenzen der Mutationen aufzuklären. *MLH1* und *PMS2* bilden das Heterodimer MutL $\alpha$ . Die Bildung dieses Dimers ist essentiell für die Reparaturaktivität (Li and Modrich 1995), außerdem ist *PMS2* in Abwesenheit von *MLH1* instabil (Chang et al. 2000; Brieger et al. 2005; Mohd et al. 2006) und die beiden Proteine werden gemeinsam in den Kern importiert (Wu et al. 2003; Brieger et al. 2005). Für die Interaktion der beiden Proteine wurden zuvor zwei verschiedene potentielle Dimerisierungsflächen beschrieben (Guarne et al. 2004; Kosinski et al. 2008; Cutalo et al. 2006). Diese unterschiedlichen Interaktionsflächen sollten mit Hilfe der Varianten aus dem Screening untersucht werden. Außerdem sollten Varianten ausgewählt werden, um die *MLH1*-Expression mit zellbiologischen, biochemischen und bioinformatischen Methoden zu untersuchen. Anschließend sollte versucht werden, das Ausmaß der gemessenen molekularen Defekte mit dem klinischen Bild der Veränderungen zu korrelieren.

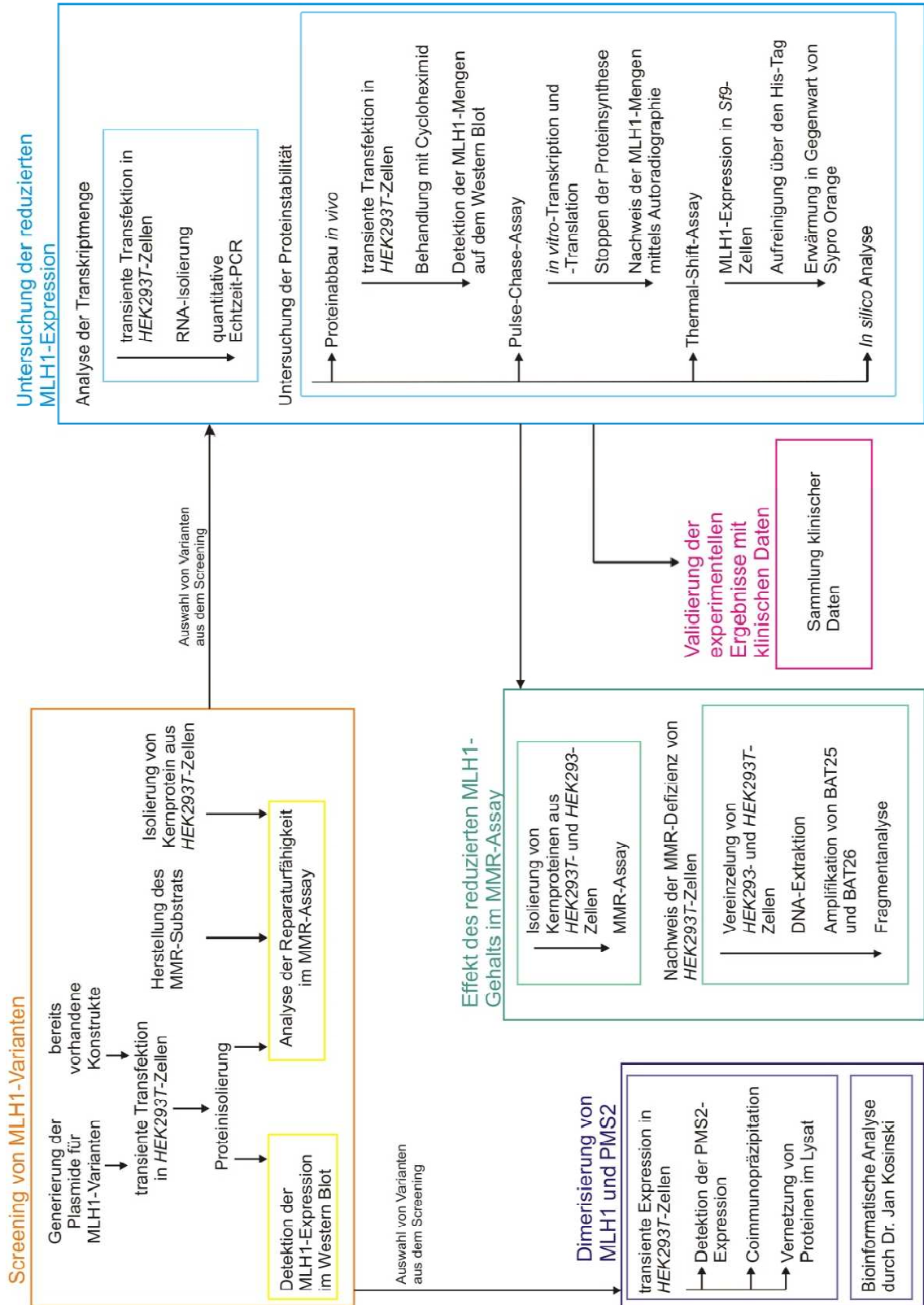


Abbildung 8: Netzplan der Arbeit

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

Übliche Laborgeräte und Materialien sind nicht aufgeführt, besondere Geräte sind im Text der jeweiligen Methoden angegeben. Eine Liste der Firmen, deren Produkte verwendet wurden, findet sich im Anhang (Tabelle A1).

Das Autoklavieren erfolgte bei 121 °C für 20 min in dem Autoklav V-75 von System.

#### 2.1.1 ORGANISMEN

##### 2.1.1.1 BAKTERIENSTÄMME

*Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen)

Genotyp: F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1*  
*araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*  $\lambda$ -

*Escherichia coli* DH10 Bac (Invitrogen)

Genotyp: F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1*  
*endA1 araD139*  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU galK*  $\lambda$ - *rpsL nupG* /pMON14272 /  
pMON7124

##### 2.1.1.2 HUMANE ZELLINIEN

*HEK293*-Zellen:

*HEK293* ist eine humane Zelllinie, die es seit Anfang der 1960er Jahre gibt. Sie stammt von menschlichen embryonalen Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney*), die mit Teilen des humanen Adenovirus 5 transfiziert wurden (Graham et al. 1977).

*HEK293T*-Zellen:

Die *HEK293T*-Zelllinie stammt von der *HEK293*-Zelllinie ab und exprimiert zusätzlich das *SV 40 large T-Antigen*. Diese Zelllinie exprimiert kein MLH1 (Trojan et al. 2002). Die verwendeten Zellen stammen von Prof. Josef Jiricny (Zürich, Schweiz).

##### 2.1.1.3 INSEKTENZELLEN

*Sf9*-Zellen (Invitrogen):

*Sf9* ist eine Insektenzelllinie aus dem Ovar der Puppe von *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al. 1977).

## 2.1.2 ZUGRIFFSNUMMERN DER VERWENDETEN SEQUENZEN

hMLH1 mRNA	U07343.1
hMLH1 Protein	AAC50285

## 2.1.3 OLIGONUKLEOTIDE

Alle Oligonukleotide wurden, soweit nicht anders angegeben, von Eurofins bezogen.

Oligonukleotide für die Sequenzierung zur Überprüfung der in *MLH1* und *PMS2* eingeführten Mutationen (siehe 2.2.10):

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
MLH1-cDNAf	atgtcgttcgtggcaggggta
MLH1-830f	aacagtgtatgcagcctattgcc
MLH1-1110f	acttctggaagtagtg
MLH1-1540f	gaagaaattaatgagcagggac
MLH1-1974f	cgactagccactgaggtgaattgg
PMS2-841f	attcacaatgcacg

Oligonukleotide für die PCR zur Kontrolle der Bacmidgenerierung (siehe 2.2.8):

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	
M13 fwd	gtaaacgacggccag	(Invitrogen)
mlh1-507r	ctgggtcccttgattgcc	
pms2-518r	gtgtgaaaataactgctgc	

Oligonukleotide für das Einführen von Mutationen in die kodierende Sequenz von *MLH1* (siehe 2.2.5):

Die Bezeichnungen der Oligonukleotide entsprechen den resultierenden Aminosäureaustauschen. Die veränderten Basen sind rot dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
MLH1-I8A	cgtggcaggggttgctcggcggctggacg
MLH1-I8Ar	cgtccagccgccgagcaaccctgccacg
MLH1-I8E	cgtggcaggggttgaaaggcggctggacg
MLH1-I8Er	cgtccagccgccgttcaaccctgccacg
MLH1-L11A	ggttattcggcggggcggacgagacagtgg
MLH1-L11Ar	ccactgtctcgtccgcccgccaataacc
MLH1-L11E	ggttattcggcgggaggacgagacagtgg
MLH1-L11Er	ccactgtctcgtctcccgccaataacc

---

MLH1-R18C	gacagtgggaactgcatcgccggcggg
MLH1-R18Cr	cccgccgcatgtagttcaccactgtc
MLH1-I19F	gtggtgaaccgcttcgcccgggggaag
MLH1-I19Fr	ctccccgccgcaagcgggtcaccac
MLH1-E23D	gcatcgccgggggatgttatccagcg
MLH1-E23Dr	cgctggataacatccccgccgcatgc
MLH1-N38H	Gagatgattgagcactgttagatgcaa
MLH1-N38Hr	ttgcatctaaacagtgtcaatcatctc
MLH1-D41G	gagaactgttaggtgcaaaatccacaag
MLH1-D41Gr	cttgtgattttgcaactaaacagtctc
MLH1-D54G	gtgattgttaaagaggaggcctgaagttg
MLH1-D54Gr	caacttcaggccttctctttaacaatcac
MLH1-G65D	gatccaagacaatgacaccgggatcagg
MLH1-G65Dr	cctgatcccgggtcattgtcttgatc
MLH1-T82I	gtgaaagggtcactattagtaaactgcag
MLH1-T82Ir	ctgcagttactaatagtgaaaccttcac
MLH1-K84E	gggtcactactagtgaaactgcagctttg
MLH1-K84Er	caaaggactgcagttcactagtaggaacc
MLH1-G101D	cctatggcttcgagatgaggcttggccagc
MLH1-G101Dr	gctggccaaagcctcatctcgaagccatagg
MLH1-E102K	atggcttcgaggtaggcttggccagcat
MLH1-E102Kr	atgctggccaaagccttacctcgaagccat
MLH1-S106R	ggtgaggcttggccagataagccatgtgg
MLH1-S106Rr	ccacatggcttattctggccaaagcctcacc
MLH1-H109Q	ggccagcataagccaagggtgctcatgttac
MLH1-H109Qr	gtaacatgagccactggcttatgtggcc
MLH1-V213M	ccaatgcctcaaccatggacaatattcgctcc
MLH1-V213Mr	ggagcgaatattgtccatgggtgaggcattgg
MLH1-I219V	ggacaatattcgctccgtcttggaaatgc
MLH1-I219Vr	gcatttccaaagacggagcgaatattgtcc
MLH1-D304V	gtccccagaatgtggtgttaatgtgcacc
MLH1-D304Vr	gggtgcacattaacaaccacattctggggac
MLH1-N338S	ctcctgggctccaagtctccaggatg
MLH1-N338Sr	catcctggaggaaactggagcccaggag
MLH1-R385C	ccaccagatggtttgtacagattcccgg
MLH1-R385Cr	ccgggaatctgtacaaccatctgggtg
MLH1-R385P	ccaccagatggtctacagattcccgg

MLH1-R385Pr	ccgggaatctgtaggaacctctggtgg
MLH1-Q542L	gtgggccttggcactgcatcaaaccaag
MLH1-Q542Lr	cttggttgatgcaagtccaaggccac
MLH1-E578G	caggttatcggggccagaccgct
MLH1-E578Gr	agcgggtgctggcccgataacctg
MLH1-K618A	gttctgaagaaggcggctgagatgc
MLH1-K618Ar	gcatctcagccgcttcttcagaac
MLH1-A681T	gcctcagtaaagaatgcactatgttctattccatc
MLH1-A681Tr	gatggaatagaacatagtgattctttactgaggc
MLH1-V716M	cctggaagtggactatggaacacattgtc
MLH1-V716Mr	gacaatgtgtccatagtccactccagg
MLH1-H718Y	gtggactgtggaatcattgtctataaagc
MLH1-H718Yr	gctttatagacaatgtattccacagtccac
MLH1-L749P	cttgctaacctgcctgatccatacaaagtctttgagagg
MLH1-L749Pr	cctctcaaagactttgtatggatcaggcagggttagcaag
MLH1-Y750X	gctaacctgcctgatctataaaaagtctttgagagggtt
MLH1-Y750Xr	aacacctctcaaagacttttatagatcaggcagggttagc

Oligonukleotide für die Herstellung des Substrates für den MMR-Assay:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>
WHCPD Puri AS	gagcgactcgctaccgtcacattgatatccgc
WHpCPD7	P-gcggatattaatgtgacggtagcgagtcgctc

Oligonukleotide für die Fragmentanalyse:

beschrieben von Papadopoulos et al. (1995)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>
BAT 25	6-FAM-tcgcctccaagaatgtaagt*
BAT 25 r	tctgcattttaactatggctc
BAT 26	NED-tgactacttttgacttcagcc*
BAT 26 r	aaccattcaacattttaacc

\* Farbmarkierung 5'

Oligonukleotide und Sonde für die quantitative *real time*-PCR\*:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>
vorwärts	agagaggacctacttccagcaa
rückwärts	atcttccaccatttccacatcagaa
Reporter-Sonde	6-FAM-ccccagaaagagacatc-Q**

\*Oligonukleotide und Sonde wurden von Applied Biosystems als Sonder-TaqMan-Assay in einem Mix geliefert

\*\*Fluoreszenzfarbstoff 5', Quencher 3'

## 2.1.4 PLASMIDE

Die Plasmidkarten von pMLH1 und pPMS2 sind im Anhang gezeigt.

<b>Name</b>	<b>Charakteristika</b>	<b>Referenz</b>
pMLH1	Kodierende Sequenz von <i>MLH1</i> im Expressionsvektor pcDNA3, <i>MLH1</i> steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Dr. Hong Zhang (Huntsman Cancer Institute, University of Utah, Salt Lake City, UT)
pPMS2	Kodierende Sequenz von <i>PMS2</i> im Expressionsvektor pGS5, <i>PMS2</i> steht unter der Kontrolle des SV40-Promotors	Prof. Bert Vogelstein (Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD)
pEGFP	Kodierende Sequenz von <i>eGFP</i> , einer veränderten Variante des <i>green fluorescent protein</i>	Persönliche Mitteilung Dr. Ricardo Biondi

Plasmide für die Expression von MLH1-Missense-Varianten:

Alle diese Plasmide basieren auf dem Plasmid pMLH1. Der Basenaustausch, der zur Veränderung der Aminosäuresequenz führt, ist unter Charakteristika angegeben. Der Name des Plasmids zeigt den Aminosäureaustausch an.

<b>Name</b>	<b>Charakteristika</b>	<b>Referenz</b>
pMLH1-I8A	Pos. 22 att→gct	diese Arbeit
pMLH1-I8E	Pos. 22 att→gaa	diese Arbeit
pMLH1-L11A	Pos. 31 ctg→gcg	diese Arbeit
pMLH1-L11E	Pos. 31 ctg→gag	diese Arbeit
pMLH1-R18C	Pos. 52 cgc→tgc	diese Arbeit
pMLH1-I19F	Pos. 55 atc→ttc	diese Arbeit
pMLH1-E23D	Pos. 67 gaa→gat	diese Arbeit
pMLH1-N38H	Pos. 112 aac→cac	diese Arbeit

---

pMLH1-D41G	Pos. 121 gat→ggt	diese Arbeit
pMLH1-G54E	Pos. 160 gga→gaa	diese Arbeit
pMLH1-G65D	Pos. 193 ggc→gac	diese Arbeit
pMLH1-T82I	Pos. 244 act→att	diese Arbeit
pMLH1-K84E	Pos. 250 aaa→gaa	diese Arbeit
pMLH1-G101D	Pos. 301 ggt→gat	diese Arbeit
pMLH1-E102K	Pos. 303 gag→aag	diese Arbeit
pMLH1-S106R	Pos. 316 agc→aga	diese Arbeit
pMLH1-H109Q	Pos. 325 cat→cag	diese Arbeit
pMLH1-T117M	Pos. 349 acg→atg	Dr. Guido Plotz (2006a)
pMLH1-D132H	Pos. 394 gat→cat	Dr. Guido Plotz (2006a)
pMLH1-V213M	Pos. 637 gtg→atg	diese Arbeit
pMLH1-I219V	Pos. 655 atc→gtc	Dr. Guido Plotz (2008)
pMLH1-R265H	Pos. 793 cgt→cat	Dr. Guido Plotz (2006a)
pMLH1-D304V	Pos. 910 gat→gtt	diese Arbeit
pMLH1-N338S	Pos. 1012 aat→agt	diese Arbeit
pMLH1-R385C	Pos. 1153 cgt→tgt	diese Arbeit
pMLH1-R385P	Pos. 1153 cgt→cct	diese Arbeit
pMLH1-V506A	Pos. 1516 gtt→gct	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-R522W	Pos. 1564 cgg→tgg	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-Q542L	Pos. 1624 cag→ctg	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-N551T	Pos. 1651 aac→acc	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-L559R	Pos. 1675 ctg→cgg	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-Q562A	Pos. 1684 cag→gcg	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-L574P	Pos. 1720 ctc→ccc	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-E578G	Pos. 1732 gag→ggg	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-A586P	Pos. 1756 gcc→ccc	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-D601G	Pos. 1803 gat→ggt	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-K618A	Pos. 1852 aag→gcg	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-L622H	Pos. 1864 ctt→cat	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-P640S	Pos. 1918 ccc→tcc	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-P648L	Pos. 1942 ccc→ctc	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-L653R	Pos. 1957 ctg→cgg	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-P654L	Pos. 1960 cct→ctt	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-R659L	Pos. 1977 cga→cta	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-R659P	Pos. 1977 cga→cca	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-R659Q	Pos. 1977 cga→caa	Dr. Guido Plotz*



pMLH1-T662P	Pos. 1984 act→cct	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-E663G	Pos. 1987 gag→ggg	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-V664R	Pos. 1990 gtg→cgg	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-L676R	Pos. 2026 ctc→cgc	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-A681T	Pos. 2041 gct→act	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-716M	Pos. 2146 gta→atg	diese Arbeit
pMLH1-H718Y	Pos. 2152 cac→tac	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-R725C	Pos. 2173 cgc→tgc	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-L749P	Pos. 2245 cta→cca	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-Y750X	Pos. 2248 tac→taa	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-K751R	Pos. 2251 aaa→aga	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-R755S	Pos. 2263 agg→agt	Dr. Guido Plotz*
pMLH1-R755W	Pos. 2263 agg→tgg	Dr. Guido Plotz*

\* persönliche Mitteilung

#### Plasmide für die Expression von MLH1 und PMS2 Fragmenten:

<b>Name</b>	<b>Charakteristika</b>	<b>Referenz</b>
pMLH1 200 Start	Sequenz von <i>mlh1</i> ab bp 601 (entspricht AS 201) mit neuem Startkodon, im Expressionsvektor pSG5	Dr. Guido Plotz (2003) unter dem Namen LC49
pMLH1 200 Start Q542L	Entspricht pMLH1 200 Start mit der Mutation Pos. 1024 cag→ctg	diese Arbeit
pMLH1 200 Start L749P	Entspricht pMLH1 200 Start mit der Mutation Pos. 1645 cta→cca	diese Arbeit
pMLH1 200 Start Y750X	Entspricht pMLH1 200 Start mit der Mutation Pos. 1648 tac→taa	diese Arbeit

#### Plasmide für die Expression von MLH1 und PMS2 in Sf9-Zellen:

Die Plasmidkarte von pFastBacHT-MLH1 ist im Anhang abgebildet.

<b>Name</b>	<b>Charakteristika</b>	<b>Referenz</b>
pFastBacHT-MLH1	Kodierende Sequenz von <i>MLH1</i> im Expressionsvektor pFastBacHT (Invitrogen), 5' befindet sich der His-Tag	Guido Plotz (Kosinski et al. 2008)

pFBMLH1HT-A681T	Beruhrt auf pFastBacHT-MLH1, enthält die Mutation Position 2041 gct→act	diese Arbeit
pFBMLH1HT-K618A	Beruhrt auf pFastBacHT-MLH1, enthält die Mutation Position 1852 aag→gcg	diese Arbeit
pFBMLH1HT-E578G	Beruhrt auf pFastBacHT-MLH1, enthält die Mutation Position 1732 gag→ggg	diese Arbeit
pFBMLH1HT-V716M	Beruhrt auf pFastBacHT-MLH1, enthält die Mutation Position 2146 gta→atg	diese Arbeit
pFBMLH1HT-H718Y	Beruhrt auf pFastBacHT-MLH1, enthält die Mutation Position 2152 cac→tac	diese Arbeit

Plasmid für die Generierung des DNA-Substrates für den MMR- Assay:

Name	Charkteristika	Referenz
pUC CPDC Bbv	Ausgangsplasmid für die Generierung des Substrats für den MMR-Assays (siehe 2.2.24), beruht auf pUC CPDC (Plotz et al. 2006a), bzw. auf pUC19 CPDC, zur Verfügung gestellt von Dr. John B. Hays (Wang and Hays 2002)	Guido Plotz (Kosinski et al. 2008)

### 2.1.5 CHEMIKALIEN

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich, AppliChem, Merck, Roth, Riedel-de-Haën, Fluka, BioRad und Serva.

Das verwendete Wasser wurde mit einer Deionisierungsanlage aufbereitet (Milli Q, Millipore).

## 2.1.6 ENZYME

**Restriktionsendonukleasen**

Asel	New England Biolabs
EcoRV	New England Biolabs
Dpnl	New England Biolabs

**Nickingendonukleasen**

Nt.BstNBI	New England Biolabs
Nt.BbvCI	New England Biolabs

**Weitere Enzyme**

PfuUltra Polymerase	Stratagene
AmpliTaqGold Polymerase	Applied Biosystems
Exonuclease V	usb Corporation
Proteinase K	Sigma
Proteinase Inhibitor	Sigma
DNase RQ1	Promega
M-MLV ReverseTranskriptase, Point Mutant	Promega
T4 Ligase	New England Biolabs
RNaseA	Roth

## 2.1.7 ANTIKÖRPER

Im Folgenden sind alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgeführt.

<b>Spezifität</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Bezeichnung / Markierung</b>	<b>Firma</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
hMLH1	Maus	monoclonal	BD Biosciences	1:2000
hMLH1	Kanninchen	polyclonal (N-20)	Santa Cruz Biotechnology	1:200
hPMS2	Kanninchen	polyclonal (E-19)	Santa Cruz Biotechnology	1:200
hPMS2	Kanninchen	polyclonal (C-20)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
hPMS2	Maus	monoclonal (A16-4)	BD Biosciences	1:250
β-Aktin	Maus	monoclonal (AC-15)	Sigma	1:5000
Maus	Ziege	HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
Kanninchen	Ziege	HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
Kanninchen	Ziege	Qdot® 800	Invitrogen	1:10000
Maus	Ziege	Alexa Flour® 680	Invitrogen	1:10000

\* HRP *horseradish peroxidase* – Meerrettichperoxidase

### 2.1.8 KITS

High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche  
 JETSTAR 2.0 Plasmid Purification MAXI Kit, Genomed  
 DyeEx® 2.0 Spin Kit, Qiagen  
 TNT-T7 coupled transcription-translation System, Promega  
 High Pure PCR Purification Kit, Roche

### 2.1.9 DNA-GRÖßENSTANDARDS

DNA Molecular Weight Marker X 0,07 - 12,2 kbp, Roche

### 2.1.10 PROTEIN-GRÖßENSTANDARDS

Broad Range - Prestained Standards, Biorad, 7 - 209 kDa  
 Dual Color - Precision Plus Protein Standard, Biorad, 10 – 250 kDa  
 Kaleidoskope - Precision Plus Protein Standard, Biorad, 10 – 250 kDa  
 NativeMark™ Unstained Protein Standard, Invitrogen, 20-1200 kDa  
 High Mark™, Invitrogen, 31-460 kDa

### 2.1.11 HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind bei den entsprechenden Methoden beschrieben. Hier sind nur häufig verwendete Puffer aufgeführt:

PBS	PAA	
TAE 50x	AppliChem	
TBS (10x)	1 M	NaCl
	0,1 M	Tris
	pH 7,5	
TBS-T	10 %	10x TBS
	0,025 %	Tween 20
TE-Puffer	100 mM	Tris
	10 mM	EDTA
	pH 8,0	

### 2.1.12 NÄHRMEDIEN FÜR ESCHERICHIA COLI

Für die Anzucht von *E. coli* wurde (LB)-Medium (Roth) verwendet. Zur Herstellung von Festmedium wurde dieses zusätzlich mit 2% (w/v) Agar-Agar versetzt. Zur Selektion von Transformanten diente Ampicillin (50 mg/l).

Für die „Blau-Weiß-Selektion“ von Bacmiden auf LB-Agar-Platten wurde dem Medium X-Gal (40 mg/l) als Substrat und IPTG (0,2 M) als Induktor hinzugegeben.

### 2.1.13 PROGRAMME UND DATENBANKEN

Standardprogramme und Programme der einzelnen Geräte, soweit sie nicht der Auswertung dienen, sind nicht aufgeführt.

#### Programme:

BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.0.9 (Hall 1999)

PyMOL, DeLano Scientific LLC

MultiGauge v3.2, Fuji

Peak Scanner Software, Applied Biosystems

GraphPadPrism, GraphPad Software

OligoAnalyzer 1.2, Gene Link

StepOne Software v2.0, Applied Biosystems

Image Lab, BioRad

Quantity One, BioRad

Serial Cloner, Serial Basics

ClustlW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>)

MAPP-MMR (<http://mappmmr.blueankh.com>)

CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de>)

PANTHER (<http://www.pantherdb.org>)

PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>)

SIFT (<http://sift.jcvi.org>)

#### Verwendete Datenbanken:

InSiGHT Datenbank (<http://www.insight-group.org>)

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Protein Database (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

Online Mendelian Inheritance of Man

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>)

ExpASy (<http://expasy.org>)

UniProt (<http://www.uniprot.org>)

Leiden Open Variation Database (<http://www.LOVD.nl>)

Mismatch Repair Gene Variants Database (<http://www.med.mun.ca/mmrvariants/>),

MMR Gene Unclassified Variants Database (<http://www.mmrmissense.info/>).

## 2.2 METHODEN

Alle in dieser Arbeit beschriebenen gentechnischen Arbeiten sind nach der Sicherheitsstufe 1 (S1/B1) des Gentechnikgesetzes und der Gentechniksicherheitsverordnung vom 01.07.1990 durchgeführt worden.

### 2.2.1 TRANSFORMATION IN *E.COLI*

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli* erfolgte nach dem Hitzeschockprinzip (Inoue et al. 1990). Die Bakteriensuspension wurde auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl Bakteriensuspension wurden 200 - 500 ng Plasmid hinzugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C, danach wurde die Bakteriensuspension erneut 5 min auf Eis gehalten, bevor die Zugabe von 200 µl S.O.C-Medium (Invitrogen) erfolgte.

Bei der Transformation nach einer Mutagenese (siehe 2.2.5) wurde der Ansatz zunächst 1 h bei 37 °C und 650 rpm im Heizblock geschüttelt und anschließend auf LB-Platten mit entsprechenden Zusätzen ausplattiert. Bei Retransformationen entfiel das Schütteln und die Bakteriensuspension wurde sofort ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.2 HERSTELLUNG VON KOMPETENTEN *E.COLI*-BAKTERIEN

Zunächst wurde ein Aliquot des zu vermehrenden Bakterienstamms auf einer LB-Platte ohne Zusätze ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gezogen. Es wurde eine Vorkultur angesetzt, für die eine Kolonie in 2 ml Hanahan-Medium (Hanahan's Broth (Sigma) versetzt mit 10 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gepickt wurde. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Morgens wurde die Vorkultur in 300 ml Hanahan-Medium überführt und bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 gezogen und dann abgekühlt. Die Bakterien wurden 10 min bei 4 °C und 4000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml 0,1 M eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und eine Inkubation von 20 min auf Eis. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in

3 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mit 15 % Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3 ANIMPFEN VON ÜBER-NACHT-KULTUREN

Für Über-Nacht-Kulturen wurden Einzelkolonien in 2 ml LB-Medium mit Zusätzen über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Für Über-Nacht-Kulturen mit einem Volumen von 250 ml wurde zunächst eine Einzelkolonie in 2 ml Vorkultur gezogen, mit der nach ca. 5 h das größere Volumen LB-Medium mit Zusätzen angeimpft wurde.

### 2.2.4 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS *E. COLI*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus 2ml Flüssigbakterienkultur erfolgte mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). Für die Isolation aus 250 ml Kultur wurde das *Plasmid Purification MAXI Kit* (Genomed) verwendet.

### 2.2.5 EINFÜHREN VON MUTATIONEN IN PLASMIDE

Punktmutationen wurden über eine PCR und einen anschließenden Restriktionsverdau von Template-Vektor mit *DpnI* in die Plasmide eingebracht. Die verwendeten Mutagenese-Oligonukleotide sind unter 2.1.3 aufgeführt.

Reaktionsansatz:

2,5 µl	Pfu Ultra Puffer 10 x
5 µl	Oligonukleotid vorwärts 1 µM
5 µl	Oligonukleotid rückwärts 1 µM
1 µl	dNTP Mix (je 2,5 mM)
25 ng	Plasmid-DNA
0,5 µl	UltraPfu Polymerase
auf 25 µl	Aqua dest.

PCR-Programm:

	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	1
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	18
Hybridisierung	55°C	1 Minute	18
Elongation	68°C	8 Minuten	18

Die Ansätze wurden in 1,5 ml Cups überführt, jeweils 1 µl *DpnI* hinzugefügt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Die *DpnI* Endonuklease baut nur methylierte DNA ab und sorgt so dafür,

dass nur die neusynthetisierten DNA-Stränge, die die Mutation besitzen, erhalten bleiben. Anschließend wurde 1 µl der verdauten PCR-Reaktion in *E.coli* transformiert (siehe 2.2.1).

### 2.2.6 GENERIERUNG VON BACMIDEN

Für die Herstellung von Bacmiden wurde das Bac-to-Bac-System von Invitrogen verwendet. Die Herstellung der Bacmide basiert auf der positionsspezifischen Transposition einer DNA-Sequenz aus dem Donorplasmid (pFastBac) in das Bacmid (das Baculovirusgenom). Die Transposition erfolgt im *E.coli*-Stamm DH10Bac, der außer dem Bacmid auch noch ein Hilfsplasmid trägt, das für die Recombinase kodiert. Das entstehende Bacmid trägt das eingebrachte Gen unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors und alle zur Virusentstehung nötigen Informationen.

Durch die Transposition des gewünschten Genes in das Bacmid wird die cDNA des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase unterbrochen, so dass Klone, in denen die Transposition erfolgreich war, durch Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden können.

Zum experimentellen Ablauf: Das FastBac-Plasmid, das für das gewünschte Gen codiert (in diesem Fall *MLH1*, *PMS2* oder Varianten), wurde in *E.coli* DH10Bac transformiert (siehe 2.2.1), 4 h bei 37°C geschüttelt und anschließend auf LB-Medium mit Tetracyclin, Gentamycin, Kanamycin, X-Gal und IPTG ausplattiert. Nach 48 h wurden weiße Klone in 2 ml LB-Medium mit Tetracyclin, Gentamycin und Kanamycin gepickt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Bacmid-DNA isoliert (2.2.7).

### 2.2.7 ISOLIERUNG VON BACMID-DNA AUS *E.COLI*

Zunächst wurden die Zellen durch eine Zentrifugation pelletiert und in 300 µl Puffer 1 aufgenommen. 300 µl Puffer 2 wurden zur Suspension hinzugegeben, nach vorsichtigem Mischen folgte eine 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl 3 M Kaliumacetat (pH 5,5) und eine weitere Inkubation von 5 min auf Eis. Nach einer Zentrifugation (10 min, 14000 g) wurde der Überstand zum Fällern der Bacmid-DNA mit 800 µl Isopropanol versetzt, 5 min auf Eis gehalten und erneut zentrifugiert (15 min, 14000 g). Das resultierende DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl TE Puffer aufgenommen. Die Bacmid-DNA lagerte bei 4 °C.

#### Puffer 1:

Tris-HCl pH 8.0	15mM,
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg / ml



Puffer 2:

NaOH	0.2 N
SDS	1 %

## 2.2.8 PCR

Die Integration des gewünschten Genes in das Bacmid wurde durch eine PCR mit anschließendem Agarosegel kontrolliert. Die Abschnitte für die Fragmente wurden ebenfalls mittels PCR amplifiziert.

## Reaktionsansatz:

10 µl	Puffer 10 x
2,5 µl	Oligonukleotid vorwärts 10µM
2,5 µl	Oligonukleotid rückwärts 10µM
5 µl	dNTP Mix (je 2,5 mM)
0,2 µl	DNA
0,25 µl	AmpliTaqGold
auf 50 µl	Aqua dest.

## PCR-Programm:

	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	1
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	35
Hybridisierung	55 °C	30 Sekunden	35
Elongation	72 °C	1 Minute	35
Elongation	72 °C	5 Minuten	1

Die Reinigung des PCR-Produkts erfolgte, wenn erforderlich, mit dem High Pure PCR Purification Kit (Roche) gemäß den Angaben des Herstellers.

## 2.2.9 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die Messung der Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm mit dem Spektrophotometer DU 800 (Beckman Coulter) oder mit dem Nanodrop (PiqLab).

## 2.2.10 SEQUENZ-PCR UND SEQUENZIERUNG

Die Sequenzanalyse der mutierten Plasmide wurde nach der Kettenabbruch-Synthesemethode nach Sanger (1977) in einem 16-Kapillar Sequenzierer (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Sequenz-PCR, in

deren Ansatz neben dNTPs auch ddNTPs (2', 3'-Dideoxyribonukleosid-Triphosphate) vorhanden sind. Diese werden eingebaut und führen zum Strangabbruch. Die ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. In der Kapillarelektrophorese werden die unterschiedlich langen Fragmente aufgetrennt und anschließend durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Ein Detektor erkennt die unterschiedliche Fluoreszenz der Farbstoffe an der jeweiligen Position, woraus schließlich die Sequenz abgeleitet wird. Nach der Sequenz-PCR wurde der Ansatz mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zur Reinigung einer größeren Anzahl von Sequenz-Reaktionen wurde Sephadex G-50 (Amersham) in einer Filterplatte (MHVN45, Millipore) mit 300 µl Aqua dest. pro Ansatz aufgequollen. Nach 3 h erfolgte die Beseitigung überschüssigen Wassers von den Gelsäulchen durch Zentrifugation (5 min, 910 g). Anschließend wurden die Proben ebenfalls mit 910 g, 5 min durch die Gelsäulchen zentrifugiert. Die Sequenzier-Oligonukleotide sind in Kapitel 2.1.3 aufgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit BioEdit.

#### Reaktionsansatz:

2 µl	BigDyes
0,3 µl	Sequenzier-Oligonukleotid 10 µM
0,3 µl	Plasmid-DNA
7,4 µl	Aqua dest.

#### Sequenz-PCR-Programm:

	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	96°C	1 Minute	1
Denaturierung	96°C	15 Sekunden	35
Hybridisierung	55°C	15 Sekunden	35
Elongation	60°C	4 Minuten	35

#### 2.2.11 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 1-2 %igen Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer (Gelkammer: Horizon 11 14, Gibco). Zum Anfärben der DNA wurde in das Gel Ethidiumbromid (2 µg/ml) gegeben. Die Proben wurden vor dem Beladen mit 10 % Ladepuffer versetzt. Die Betrachtung des Gels sowie die Digitalisierung erfolgten mit dem Molecular Imager GelDoc XR (Bio-Rad).

DNA Ladepuffer:

Wasser	3,75 ml
Glycerin	50 % v/v
TAE 40X	250 µl
SDS	0,5 %
Farbstoff	Bromphenolblau: Xylencyanol

## 2.2.12 ZELLKULTUR

### 2.2.12.1 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt. Da die Großquadrate jeweils ein definiertes Volumen von  $0,1 \text{ mm}^3$  haben, lässt sich so die Konzentration der Zellsuspension bestimmen.

### 2.2.12.2 KULTIVIERUNG VON *HEK293*- UND *HEK293T*-ZELLEN

Die Zellen wuchsen bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$  adhärent in DMEM Medium (DMEM-*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco), versetzt mit Penicillin und Streptomycin (100x, PAA) und  $10 \text{ } \%$  FCS (Fötales Kälberserum, *fetal calf serum*, Sigma). Für die Zellkultur wurden Schalen und Flaschen von Greiner und Sarstedt verwendet.

Bei Erreichen einer ca.  $90 \text{ } \%$ igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Das Kulturmedium wurde von den Zellen abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit  $1 - 3 \text{ ml}$  Trypsin/EDTA-PBS-Lösung (Lonza), bei  $37^\circ\text{C}$  ca.  $5 \text{ min}$  im Zellkulturschrank inkubiert. Wenn sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurden sie in DMEM mit Zusätzen resuspendiert. Die Zugabe des Mediums stoppt die Reaktion des Trypsins. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation pellettiert ( $2 \text{ min}$ ,  $500 \text{ g}$ ), in frischem Kulturmedium aufgenommen und in eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

Alle vier Wochen wurden die Zellen mit dem Kit Venor<sup>®</sup>GeM (Minerva Biolabs) mittels PCR auf Mycoplasmenbefall untersucht.

### 2.2.12.3 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON *HEK293*- UND *HEK293T*-ZELLEN

Zunächst wurden verschraubbare Gefrier-Cups mit je  $0,9 \text{ ml}$  Normalmedium, versetzt mit  $20 \text{ } \%$  DMSO, vorbereitet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen,  $5 \text{ min}$  mit Trypsin bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend in DMEM-Medium aufgenommen und in ein  $15 \text{ ml}$  Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation ( $3 \text{ min}$ ,  $800 \text{ g}$ ) wurde das Medium entfernt, die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und jeweils  $0,9 \text{ ml}$  Zellsuspension in die vorbereiteten Cups gegeben. Die Cups wurden direkt in Eis gestellt, dann bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren und nach  $24 \text{ h}$  in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad erwärmt, bis die Zellsuspension flüssig war und dann in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden sie zentrifugiert (2 min, 500 g), in 5 ml Medium aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) gegeben.

#### 2.2.12.4 TRANSFEKTION CaCl<sub>2</sub>

Die Zellen wurden 3 h bis 18 h vor der Transfektion in Zellkulturschalen (Durchmesser 9 cm) ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 80 % transfiziert. Für den Transfektionsmix wurden zunächst 5 µg Plasmid-DNA pro verwendetem Plasmid und 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> bei einem Endvolumen von 500 µl in Aqua dest. gemischt. Die DNA-Calciumchloridlösung wurde tropfenweise zu 500 µl 2 x HBS hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur, bevor die Lösung in das Kulturmedium getropft wurde. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

#### 2 x HBS:

Hepes pH 7,05	50 mM
NaCl	280 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Dihydrat	1,5 mM

#### 2.2.12.5 TRANSFEKTION MIT PEI

3 bis 18 h vor der Transfektion wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 9 cm) ausgesät. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80 %. Für die Transfektion wurden 5 µg Plasmid-DNA, 20 µl PEI (Polyethylenimin, 1 mg / ml, Polysciences) und Normalmedium ohne Antibiotika und FCS (Endvolumen 1 ml) vermischt und 30 min inkubiert. Bei der Transfektion mit zwei unterschiedlichen Plasmiden wurden 5 µg DNA pro Plasmid verwendet. Anschließend wurde der Transfektionsmix auf die Zellen getropft.

#### 2.2.12.6 VEREINZELUNG VON ZELLEN FÜR DIE EINZELZELLFRAGMENTANALYSE

Die Zellen wurden abgelöst, in Medium aufgenommen und durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Dann wurden sie gezählt, so weit verdünnt, dass sich in 10 µl Medium eine Zelle befindet und in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach einigen Stunden, wenn die Zellen sich am Untergrund angeheftet hatten, wurden die Schalen markiert, in denen sich eine Zelle befand. Die Zellen wurden 14 Tage gezogen, alle drei Tage wurde das Medium gewechselt. Dann wurden diese Zellen wiederum vereinzelt und in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät, so dass schließlich in einer 96-Well-Platte nur Nachkommen einer Zelle wuchsen.

#### 2.2.12.7 KULTIVIERUNG VON Sf9-ZELLEN

Sf9-Zellen wurden für die Expression rekombinanter Proteine genutzt. Sf9 ist eine klonale Linie aus dem Ovar der Puppe von *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al. 1977). Sf9-Zellen können in größeren Mengen kultiviert werden, zeigen meistens höhere Expressionsraten als andere eukaryotische Zelllinien und im Gegensatz zur Expression in *E.coli* erfolgt die co- und posttranslationale Prozessierung vieler Proteine, sowie die Lokalisation membranständiger Proteine (Bouvier et al. 1998). Der Virus *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV, Familie der *Baculoviridae*) infiziert Sf9-Zellen. Diese Eigenschaft macht man sich zu Nutze. Anstelle des viralen Polyhedrin-Genes können andere Gene in das Genom von AcNPV eingebracht werden und so in Sf9-Zellen exprimiert werden.

Sf9-Zellen können sowohl in Suspension als auch adhären kultiviert werden. Dauerhaft wurden die Zellen in Sf-900 II Medium (Sf-900 II SFM, Serum Free Medium Complete, Gibco), serumfrei mit dem Zusatz von Penicillin und Streptomycin (100x, PAA) in Suspension kultiviert. Die Zellen wurden bei 26 °C, 150 rpm und einer Dichte von  $0,8 - 4 \cdot 10^6$  Zellen / ml gehalten.

#### 2.2.12.8 TRANSFEKTION VON Sf9-ZELLEN MIT BACMID-DNA

Für die Transfektion wurden in 6-Well-Platten 1,2 Mio Zellen / Well ausgesät. Eine Stunde standen die Platten bei 26 °C, um die Zellen adhären zu lassen, dann wurden die Zellen mit Medium ohne Zusätze gewaschen. Inzwischen wurde der Transfektionsmix vorbereitet. 100 µl Medium ohne Antibiotika wurden mit 6 µl liposomalem Transfektionsreagenz (Cellfectin, Invitrogen) versetzt und 100 µl Medium ohne Antibiotika wurden mit 1,5 µg Bacmid-DNA gemischt. Beide Ansätze wurden zusammengegeben, vermischt und 15 – 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsmix wurde mit 800 µl Medium versetzt und auf die gewaschenen Zellen gegeben. Nach 4 – 5 h erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Nach 72 h bei 26 °C wurde der virushaltige Überstand abgenommen und durch eine Zentrifugation (1000 g, 5 min) von Zelltrümmern gereinigt.

#### 2.2.12.9 AMPLIFIKATION DES VIRUS

Zur Amplifikation des Virus wurde Sf9-Suspensionskultur mit dem virushaltigen Überstand aus der Transfektion infiziert. Der Überstand (2 ml) wurde zu 8 ml Zellsuspension gegeben. Die Endkonzentration der Zellsuspension betrug 2 Mio. Zellen / ml. Nachdem die Zellen 72 h bei 26 °C und 150 rpm Virus produzierten, wurde nach einer Zentrifugation (1000 g, 2 min) der Überstand abgenommen (P1). Mit diesem Überstand wurde nun eine weitere Suspensionskultur infiziert. Jetzt wurde der gesamte Überstand verwendet, um ein Volumen von 100 ml Zellsuspension zu infizieren, wiederum mit einer

Endkonzentration von 2 Mio. Zellen / ml (P2). Der Überstand, der nach weiteren 72 h abgenommen und wiederum durch eine Zentrifugation gereinigt wurde, diente schließlich der Expression des gewünschten Proteins. Überstände, die nicht sofort verwendet wurden, lagerten bei 4 °C und im Dunkeln.

#### 2.2.12.10 EXPRESSION VON PROTEINEN IN *SF9*-ZELLEN

Für die Expression des Zielproteins wurden 100 ml Zellsuspension mit einer Konzentration von 2 Mio. Zellen / ml, die mit 7 ml Überstand aus der P2 versetzt wurde, verwendet. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und das Protein über den His-Tag aufgereinigt (siehe 2.2.16.5)

#### 2.2.13 FLUORESZENZMIKROKOPIE

Die GFP-Fluoreszenz wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M (Zeiss) mit zugehöriger Kamera und Software (AxioVision 3.1) beobachtet. Die Anregung erfolgte durch eine UV-Lampe.

#### 2.2.14 DNA-EXTRAKTION AUS *HEK293*- UND *HEK293T*-ZELLEN

Der Zellüberstand wurde sauber abgenommen, danach wurden die Zellen in DNA-Extraktionspuffer aufgenommen und in eine 96-Well-PCR-Platte (Sarstedt) pipettiert. Es erfolgte eine 2 stündige Inkubation bei 60 °C zum Proteinabbau der DNA-bindenden Proteine, anschließend wurde die Proteinase K durch eine Inkubation von 15 min bei 95 °C inaktiviert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C .

##### DNA-Extraktionspuffer:

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
Proteinase K	50 µg/ ml

#### 2.2.15 RNA-ISOLIERUNG AUS *HEK293*- UND *HEK293T*-ZELLEN

Das Medium wurde von den Zellen dekantiert, kaltes PBS wurde hinzugefügt und die Zellen wurden mit dem Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch eine Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert, der Überstand sauber abgenommen und die Zellen in 1ml Trizol (Tri Reagent, Sigma) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Lösungen vermischt. In einer Zentrifugation (10 min, 12000 g, 4 °C) wurden die Phasen voneinander getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach einem

kurzen Schütteln folgte eine weitere Inkubation von 10 min und anschließend wurde die gefällte RNA abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 12000 g). Das Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, die RNA in 50 µl Aqua dest. resuspendiert und bei -80°C gelagert.

## 2.2.16 ISOLIERUNG VON PROTEINEN

### 2.2.16.1 ISOLIERUNG VON NATIVEM GESAMTPROTEIN AUS *HEK*-ZELLEN

Für die Isolierung von Gesamtprotein aus *HEK293*- oder *HEK293T*-Zellen wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden nach Zugabe von 10 ml PBS mit einem Zellschaber gelöst. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (1000 g, 2 min) zur Sedimentation der Zellen. Die Zellen wurden im dreifachen Volumen des Zellpellets in eiskaltem Puffer A resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Der hypotone Puffer A lässt die Zellen anschwellen. Anschließend wurde die Zellsuspension zum Zellaufschluss für 5 min in Stickstoff gefroren und zum Auftauen auf Eis gestellt. Danach wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Puffer B gemischt. Der hypertone Puffer B sorgt dafür, dass ionische bzw. polare Wechselwirkungen gemindert werden, so können z.B. auch DNA-assoziierte Proteine gelöst werden. Die Proben wurden 30 min bei 4 °C im Kühlraum gedreht, dann zentrifugiert (4 °C, 10 min, 20000 g) und der Überstand (nativer Gesamtproteinextrakt) in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford (siehe 2.2.17) bestimmt und der Extrakt, nach dem Gefrieren in Stickstoff, bei -80°C gelagert.

#### Puffer A:

HEPES pH 7,6	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	0,1 mM
NaCl	10 mM

#### Puffer B:

HEPES pH 7,6	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	0,1 mM
NaCl	840 mM
Glycerol	40% (v/v)

### 2.2.16.2 KERNEXTRAKTION AUS *HEK*-ZELLEN

Die Extraktion von Kernproteinen wurde weitgehend nach Dignam et al. (1983) durchgeführt. Für die Extraktion wurden 10 große Schalen (150 cm<sup>2</sup>) Zellen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90 % inkubiert. Das Medium wurde von den Zellen dekantiert,

die Zellen wurden in kaltem PBS abgekratzt und auf Eis gesammelt. Es folgte eine Zentrifugation (500 g, 3 min), nach der das Zellpellet im kaltem PBS aufgenommen und in ein 15 ml Gefäß überführt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation (1850 g, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet im fünffachen Volumen hypotonem Puffer aufgenommen und 2 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (1850 g, 5 min, 4 °C) wurde die Schwellungsdifferenz geschätzt und erneut hypotoner Puffer hinzugegeben. Das Volumen des hypotonen Puffers entsprach dem zweifachen Volumen des anfänglichen Pelletvolumens minus der Schwellungsdifferenz. Die Zellen wurden resuspendiert und weitere 10 min auf Eis gehalten. In einem Dounce-Homogenisator (Wheaton) wurden die Zellen mit 15 Schlägen aufgeschlossen. In zwei anschließenden Zentrifugationen (10000 g, 2 min, 4°C und 12000 g, 3 min, 4 °C) wurden Zelltrümmer entfernt. Das Volumen der resultierenden Kernpellets bestimmt das Volumen der nun zugegebenen Puffer: die Kerne wurden im halben Volumen Resuspensionspuffer mit abgeschnittener Pipettenspitze vorsichtig in den Dounce überführt, und während der Dounce-Homogenisator gevortext wurde, erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens Hochsalzpuffer. Nach weiteren 8 Schlägen im Dounce erfolgte eine Inkubation unter leichtem Drehen im Kühlraum (4 °C). Kernmembranen und nicht aufgeschlossene Kerne wurden durch eine Zentrifugation (20000 g, 30 min, 4 °C) sedimentiert, der Überstand wurde abgenommen und für 3 h bei 4 °C gegen 100-faches Volumen Dialysepuffer dialysiert. Der Dialyseschlauch (Cellulose Ester Dialysis Membrane, Spectra / Por Tech) wurde zuvor eine halbe Stunde in Aqua dest. vorgequollen und vor dem Befüllen mit Dialysepuffer gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (21000 g, 10 min, 4 °C) wurde die Proteinkonzentration des Überstandes mittels Bradford Assay (siehe 2.2.17) bestimmt. Die Lagerung des Kernextraktes erfolgte bei -80 °C, nach Frosten in flüssigem Stickstoff.

Hypotoner Puffer:

HEPES pH 7,5	20 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
Vor Benutzung hinzugefügt:	
DTT	0,5 mM
PMSF	1 mM



Resuspensionspuffer:

HEPES KOH pH 7,5	50 mM
Saccharose	10 % (w/v)

Vor Benutzung hinzugegeben:

DTT	1 mM
PMSF	0,2 mM

Hochsalzpuffer:

HEPES KOH pH 7,5	50 mM
Saccharose	10 % (w/v)
KCl	840 mM

Dialysepuffer:

HEPES KOH pH 7,6	25 mM
KCl	100 mM
EDTA	0.01 mM

Vor Benutzung hinzugefügt:

DTT	0,5 mM
PMSF	0,2 mM

### 2.2.16.3 NACHWEIS DER EXPRESSION DES ZIELPROTEINS IN *Sf9*-ZELLEN

Diese Methoden wurde genutzt, um die Expression des gewünschten Proteins in *Sf9*-Zellen zu kontrollieren.

Von der *Sf9*-Suspensionskultur (P2) wurden 2 ml entnommen, pelletiert (6000 g, 2 min), in 150 µl Lysispuffer aufgenommen und mit dem Ultraschall-Desintegrator (Sonifier 150, Branson) 10 sec auf Stufe 7 aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (20000 g, 5 min), nach der der Überstand in ein frisches Cup überführt wurde. Die Analyse der Expression erfolgte mittels eines SDS-Gels, das mit Coomassie gefärbt wurde (2.2.21).

Triton Lysispuffer:

Tris HCl pH 7,4	50 mM
Saccharose	0,27 M
Triton X-100	1 % (v/v)
NaF	50 mM
EDTA	1 mM

#### 2.2.16.4 ISOLIERUNG VON NATIVEM PROTEIN AUS *Sf9*-ZELLEN

Die Extraktion von nativen Proteinen aus *Sf9*-Zellen arbeitet nach demselben Prinzip wie das Protokoll für die *HEK293*-Zellen (siehe 2.2.16.1), jedoch wurden leicht veränderte Puffer verwendet und der Zellaufschluss erfolgte im Dounce-Homogenisator.

Für die Extraktion von Gesamtprotein aus *Sf9*-Zellen wurden die Zellen mit einer Zentrifugation (1000 g, 5 min) pelletiert und mit PBS gewaschen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation (1850 g, 5 min, 4 °C), nach der der Überstand sehr sauber abgenommen wurde. Die Zellen wurden im dreifachen Volumen Puffer A aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss im Dounce-Homogenisator (Wheaton) mit 15 Schlägen. Nach der Zugabe von Puffer B (gleiches Volumen wie Puffer A) erfolgte eine Inkubation unter leichtem Drehen im Kühlraum bei 4 °C. Abschließend wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen mit einer Zentrifugation (10000 g, 15 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

##### Puffer A *Sf9*:

HEPES pH 7,6	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	0,1 mM
Vor Benutzung hinzugefügt:	
β-Mercaptoethanol	0,035%
PMSF	0,2 mM

##### Puffer B *Sf9*:

HEPES pH 7,6	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	0,1 mM
NaCl	600 mM
Glycerol	40 % (v/v)
Vor Benutzung hinzugefügt:	
β-Mercaptoethanol	0,035%
PMSF	0,2 mM

#### 2.2.16.5 AUFREINIGUNG VON PROTEINEN ÜBER DEN HIS-TAG

Um eine einfache Aufreinigung der Proteine aus *Sf9*-Zellen zu ermöglichen, wurden die Proteine mit His-Tag (6xHis) exprimiert (siehe pFastBac HT Plasmide 2.1.4). Der His-Tag ermöglicht eine Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose. Der His-Tag wird über NTA (Nitrolotriessigsäure) an die Agarose gebunden, die Elution erfolgte mit Imidazol.

Zunächst wurden die Lysate (siehe 2.2.16.4) mit Verdünnungspuffer auf eine NaCl-Konzentration von 250 mM eingestellt und mit 0,2 mM PMSF und 10 mM Imidazol versetzt. Ni-NTA-Agarose (Qiagen) wurde drei-mal in PBS gewaschen und dann 60 min mit den Extrakten bei 4 °C unter leichtem Drehen inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA Agarose mittels Zentrifugation (1800 g, 5 min, 4 °C) sedimentiert und dann viermal mit Waschpuffer 1 gewaschen. In jedem Waschschrift wurde die Agarose in Puffer resuspendiert, 2 min auf Eis gehalten, zentrifugiert und der Überstand sauber abgenommen. Dann erfolgten drei Waschschrift mit Waschpuffer 2. Für die Elution wurden 300 µl Elutionspuffer hinzugegeben, 2 min auf Eis inkubiert, die Agarose sedimentiert (10000 g, 2 min, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Es folgten zwei weitere Elutionsschritte mit jeweils 600 µl Elutionspuffer. Die Proteinkonzentration der Eluate wurden im Bradford Assay gemessen (siehe 2.2.17) und die Eluate in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Verdünnungspuffer:

Hepes pH 7,6	25 mM
Glycerol	10 % (v/v)
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

Waschpuffer 1:

Hepes pH 7,6	25 mM
Glycerin	10 % (v/v)
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM,
Mercaptoethanol	0,035 % (v/v)

Waschpuffer 2:

Hepes pH 7,6	25 mM
Glycerin	10 % (v/v)
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaCl	100 mM
Imidazol	10 mM,
Mercaptoethanol	0,035 % (v/v)

Elutionspuffer:

Hepes pH7,6	25 mM
Glycerin	10 % (v/v)
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaCl	100 mM
Imidazol	250 mM
Mercaptoethanol	0,035 % (v/v)

**2.2.17 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD**

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250 verschiebt sich bei der Bindung an Proteine von 465 nm zu 595 nm. Dies wird bei der photometrischen Bestimmung des Proteingehaltes ausgenutzt.

800 µl Quick Start Bradford Reagenz (Bio-Rad, München) wurden mit 2 µl der zu messenden Lösung versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Absorption dieses Gemisches bei 595 nm gegen einen Nullwert (800 µl Bradfordreagenz mit 2 µl Aqua dest.) in einem Photometer (DU800 Beckmann Coulter) gemessen. Die Konzentration wurde mittels der im Gerät hinterlegten Eichgerade automatisch berechnet.

**2.2.18 AUFKONZENTRIEREN VON PROTEINLÖSUNGEN**

Zum Aufkonzentrieren von Proteinlösungen wurden Amicon Ultra Filter (Millipore) verwendet. Die Probe wurde durch einen Filter entsprechender Größe zentrifugiert und anschließend aus dem umgedrehten Filter zurückgewonnen.

**2.2.19 SDS-GELELEKTROPHORESE**

Die denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen erfolgte leicht abgewandelt nach Lämmli (1970). Es wurden 10%ige Acrylamidgele mit Sammelgel und 10 Taschen (klein) oder 28 Taschen (groß) verwendet. Die Gele wurden nach dem Schema in Tabelle 1 gegossen. Für kleine Gele wurde die Gelkammer Protean II (Bio-Rad) und für große Gele die Kammer Double Wide (C.B.S.) verwendet. Ein kleines Gel lief bei 25 mA für ca. 80 min, ein großes Gel bei 40 mA in Acrylamidgel-Laufpuffer.

Für ein SDS-Gel wurden 10 - 50 µg Gesamtprotein verwendet. Die Probe wurde mit 25 % Roti-Load1 Ladepuffer (Roth) versetzt und 3 min bei 90 °C denaturiert.

Acrylamidgel-Laufpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1 % (w/v)

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten 10 %igen Gele mit Sammelgel

	Gel (klein)		Gel (groß)	
	Sammelgel	Trenngel	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8%	0,33 ml	2 ml	0,66 ml	4 ml
TrisHCl 1,88 M pH 8,8	0,4 ml		0,8 ml	
TrisHCl 0,625 M pH 6,8		1,2 ml		2,4 ml
SDS 0,5 %	0,4 ml	1,2 ml	0,8 ml	2,4 ml
Aqua dest.	0,87 ml	1,6 ml	1,74 ml	3,2 ml
TEMED	2 µl	5 µl	4 µl	10 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	10 µl	30 µl	20 µl	60 µl

Auftrennen größerer Proteinkomplexe:

Die Auftrennung größerer Proteinkomplexe erfolgte in fertigen Gradientengelen mit einem Acrylamidgehalt von 3-8 % (NuPAGE Novex Bis-Tris-Acetat Mini Gels) von Invitrogen. Für diese Gele wurde die Gelkammer XCell SureLock® (Invitrogen) und der Laufpuffer NuPAGE Tris-Acetate-SDS Running Buffer (Invitrogen) verwendet. Ein Gel lief eine Stunde bei 150 V. Anschließend wurde das Gel für 10 min in Laufpuffer mit 0,04 % SDS geschwenkt. Anschließend folgte der Western Blot (2.2.20.1)

## 2.2.20 PROTEINDETEKTION

## 2.2.20.1 WESTERN BLOT

Die SDS-Gele wurden 2 h bei 1 mA / cm<sup>2</sup> in der Semidry-Blotapparatur (Transblot semidry transfer cell, Bio-Rad) geblottet. Filterpapier (Munktell, GE Healthcare) und Membran (Nitrocellulose Membran PROTRAN, Whatman) wurden zuvor im Blotpuffer angefeuchtet. Nach dem Blotten wurde die Membran zur Kontrolle des Proteintransfers mit Ponceau angefärbt und in TBS-T entfärbt. Anschließend erfolgte die Inkubation in Blocklösung (TBS-T mit 5 % Trockenmilchpulver) für 1 h oder über Nacht bei 4 °C, um unspezifische Proteinbindungen abzudecken. Anschließend erfolgte die Detektion (2.2.20.2).

Blotpuffer:

Tris pH 8,2 - 8,4	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %
Methanol	20 %

Ponceaulösung:

Ponceau S	0,1 %
Essigsäure	5 %

## 2.2.20.2 DETEKTION

Alle Antikörper wurden entsprechend den Angaben der Hersteller 1:200 bis 1:10000-fach in TBS-T mit 5 % Milchpulver verdünnt (siehe 2.1.7). Zunächst wurde die Membran 1 h in der Lösung mit dem primären Antikörper inkubiert, anschließend 3 x mit TBS-T für 5 min gewaschen, dann 1 h im sekundären Antikörper inkubiert und erneut 3 x für 5 min gewaschen.

Wenn als Sekundärantikörper HRP(*horseradish peroxidase*)-gekoppelte Antikörper verwendet wurden, wurde die Membran mit der Detektionslösung (Luminata™ Forte Western HRP Substrate, Millipore) behandelt, bevor sie im LAS-4000 mini (Fuji) detektiert wurde.

Bei der Verwendung eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpers entfiel die Inkubation mit einer Detektionslösung und die Fluoreszenz wurde je nach verwendetem Antikörper bei 680 nm oder bei 800 nm im FLA-9000 (*Multi purpose Image Scanner*, Fuji) gemessen. Die Inkubation mit einem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper erfolgte im Dunkeln. Die Fluoreszenz-Zweitantikörper ermöglichen es, zwei Proteine zur gleichen Zeit auf einem Blot nachzuweisen. Wenn die Erstantikörper verschiedenen Ursprungs sind, können verschiedene Zweitantikörper eingesetzt werden, die bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert werden können.

Die Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm MultiGauge v3.2 (Fuji).

## 2.2.21 COOMASSIEFÄRBUNG VON SDS-GELEN

Für die Färbung mit Coomassie erfolgte die Inkubation des Gels für einige Stunden oder über Nacht in Coomassie-Lösung. Anschließend wurde das Gel in 20 % Methanol entfärbt und eingescannt.

Coomassie-Lösung:

Ammoniumsulfat	10 %
Phosphorsäure	2 %
CBB G-250	0,1 %

Vor Gebrauch 20 % Methanol hinzufügen

### 2.2.22 AUTORADIOGRAPHIE

Für die Detektion radioaktiv markierter Proben im SDS-Gel wurde die Gelelektrophorese durchgeführt wie in 2.2.19 beschrieben. Anschließend wurde das Gel 3 mal 10 min in Geltrocknungspuffer geschwenkt und zwischen Cellophan-Folien (Roth) im Geltrocknungsrahmen (Roth) unter dem Anzug getrocknet. Zur Detektion wurde das getrocknete Gel in eine Plastikfolie gelegt und auf eine Bildplatte (*Imaging Plate*, Fuji) in eine Expositionskassette gelegt. Nach 24 h erfolgte die Detektion mit dem FLA 9000 (*Multi purpose Image Scanner*, Fuji) im Modus IP. Die Auswertung des Autoradiogramms erfolgte mit dem Programm MultiGauge v3.2 (Fuji). Die Bildplatten wurden mit dem *Eraser* (Fuji) gelöscht.

#### Geltrocknungspuffer:

Methanol	25 %
Glycerol	20 %
Essigsäure	10 %

### 2.2.23 NATIVE PROTEIN-GELELEKTROPHORESE MIT WESTERN BLOT

Für die nativen Gele wurde das Native PAGE™ Bis-Tris Gel System von Invitrogen verwendet. Die Gradientengele mit einem Acrylamidgehalt von 4 - 16 % wurden mit den zugehörigen Laufpuffern und dem Ladepuffer in dem Gelkammersystem XCell SureLock® (Invitrogen) benutzt. Das Gel lief 100 min mit einer konstanten Spannung von 150 V.

Anschließend wurde auf eine PVDF-Membran (Millipore) geblottet. Dafür wurde das Tank-Blot-System MINIVE Blotter (Hofer miniVE, Amersham) verwendet. Die Membran wurde zuvor für 30 sec mit Ethanol aktiviert, gespült und dann 10 min in Transferpuffer (NuPage Transfer Buffer, Invitrogen) inkubiert. Das Gel wurde vor dem Blotten ebenfalls in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer wurde mit einer konstanten Spannung von 25 V für 1 h durchgeführt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Proteine auf der Membran in 8 % Essigsäure für 15 min. Dann wurde die Membran getrocknet. Auf der getrockneten Membran wurden die Markerbanden mit Bleistift angezeichnet. Die Membran wurde zunächst mit Methanol, dann mit Aqua dest. gespült und nach der Ponceaufärbung (zur Kontrolle des Proteintransfers) in TBS-T mit 5 % Milchpulver für eine Stunde geblockt. Die Detektion wurde durchgeführt wie unter 2.2.20.2 beschrieben.

#### 2.2.24 HERSTELLUNG DES MMR-PLASMIDS

Die Herstellung des Substrats für den MMR-Assay erfolgte im Prinzip wie von Wang et al. beschrieben (2000). Das Ausgangsplasmid (siehe 2.1.4) basiert auf pUC19 und wurde mehrfach modifiziert. Es kann in *E.coli* repliziert werden, nicht jedoch in humanen Zellen und enthält Restriktionsschnittstellen für verschiedene Enzyme, die für die Herstellung des Substrates benötigt werden.

Das DNA-Substrat für den MMR-Assay (siehe 2.2.25) benötigt eine Basenfehlpaarung, die später im Assay repariert werden soll, und einen Einzelstrangbruch, der im Reparaturprozess als Strangunterscheidungssignal dient. In Abbildung 9 ist die Herstellung des MMR-Plasmids schematisch dargestellt.

Für die Herstellung des Substrates wurden zunächst 50 µg Ausgangsplasmid mit der Nicking-Endonuklease Nt.BstNB I (NEB) 3 h bei 55 °C verdaut, so wird ein 32 bp großes Fragment aus einem der Stränge entfernt. Anschließend wurde das herausgeschnittene Oligomer entfernt, indem ein zum herausgeschnittenen Fragment komplementäres Oligomer (WHCPDPuriAS) in 50-fachem molarem Überschuss hinzugefügt wurde. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 85 °C inkubiert und anschließend langsam auf 20 °C abgekühlt. Die hybridisierten Oligomere wurden durch eine Amicon-Filtration (Millipore) entfernt. Anschließend wurde ein neues Oligomer einligiert. Das neue Oligomer führt zur Basenfehlpaarung. Für die Ligation wurde die Plasmidlösung auf 90 µl mit TE-Puffer aufgefüllt, Ligationspuffer und das einzuligierende Oligomer (WHpCPD) hinzugefügt, bei 80 °C 5 min inkubiert, langsam auf 20 °C abgekühlt und mit DTT und ATP (Endkonzentration jeweils 1 mM) versetzt. 50 U der T4-Ligase (NEB) wurden hinzugefügt und der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Zur Beseitigung der Ligase und des Ligasepuffers wurde das Plasmid durch eine Ethanol-fällung gereinigt. Die Plasmidlösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol versetzt und 30 min bei -20 °C inkubiert. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation (20000 g, 10 min, 4 °C) sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und in 50 µl Aqua dest. gelöst. Da sich die eingeführte Basenfehlpaarung in der Erkennungssequenz von EcoRV befindet, kann Plasmid-DNA, die die Basenfehlpaarung nicht enthält, durch eine Hydrolyse mit EcoRV mit einem anschließenden Exonukleaseverdau beseitigt werden. Zunächst wurde die Plasmidlösung 1 h bei 37 °C mit EcoRV verdaut, anschließend mit Exonuklease V. Dann erfolgte die Inaktivierung der Enzyme bei 65 °C für 10 min, und die Plasmid-DNA wurde erneut durch eine Ethanol-fällung gereinigt und in Aqua dest. aufgenommen. Schließlich wurde das Plasmid mit der Nicking-Endonuklease Nt.BbvCI verdaut. Diese Endonuklease führt den Einzelstrangbruch ein, der als Strangunterscheidungssignal benötigt wird. Abschließend erfolgte eine Reinigung über eine Amicon-Filtration. Die Plasmidlösung wurde auf 100 µl



aufgefüllt und die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop. Alle Schritte wurden durch Agarosegele kontrolliert.

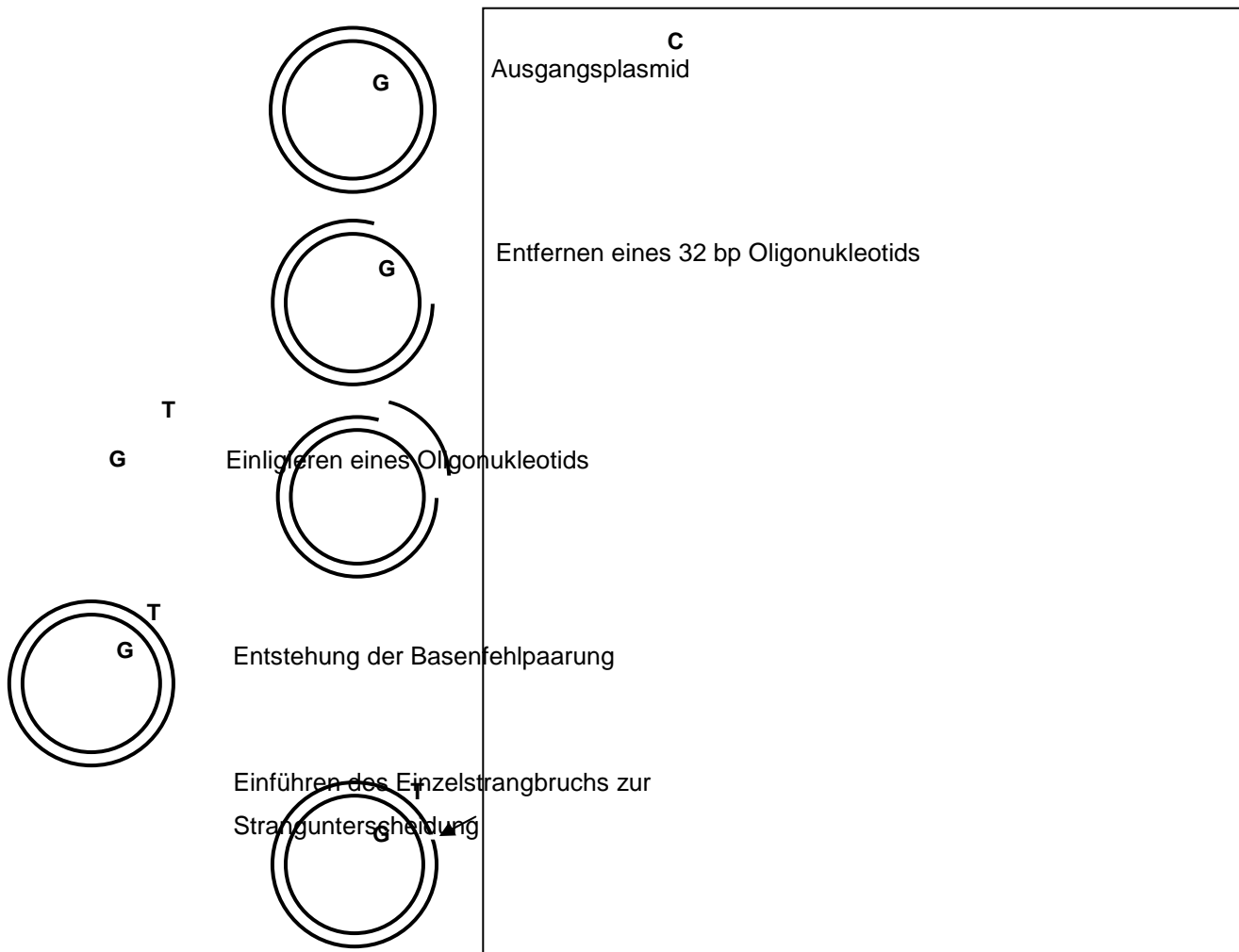


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Generierung des Substrates für den MMR-Assay. Aus dem Ausgangsplasmid wird ein 32 bp langes Fragment herausgeschnitten und durch ein neues Oligonukleotid ersetzt. Das neue Oligonukleotid weicht in einer Base von dem entfernten Fragment ab, so entsteht bei der Ligation eine Fehlpaarung. Abschließend wird mit einem Restriktionsenzym ein Einzelstrangbruch eingeführt, der später der Strangunterscheidung dient.

### 2.2.25 MMR-ASSAY

Der MMR-Assay wurde durchgeführt wie in Plotz et al (2006a) beschrieben und beruht auf zuvor beschriebenen MMR-Assays (Corrette-Bennett and Lahue 1999; Wang and Hays 2002). Eine Darstellung des Ablaufs des Assays findet sich in Abbildung 10.

Für den MMR-Assay wurde ein Substrat mit einer G-T Fehlpaarung eingesetzt, das zusätzlich über einen Einzelstrangbruch 3' von der Fehlpaarung verfügt, der der Strangunterscheidung dient. Für die Reparaturreaktion wurde das zu reparierende Substrat mit Proteinextrakt von Zellen, die mit MutLa transformiert wurden, inkubiert. Für

den MMR-Assay wurden nur Proteinextrakte verwendet, die mit dem Protokoll zur nativen Proteinextraktion hergestellt wurden (siehe 2.2.16.1). Der Reparaturreaktion wurde Kernextrakt von *HEK293T*-Zellen hinzugefügt. Dieser Kernextrakt enthält kein MLH1, da *HEK293T*-Zellen MLH1-defizient sind, gewährleistet aber, dass alle anderen Faktoren, wie zum Beispiel MutS $\alpha$  oder EXO I, die für die Reparatur benötigt werden, in ausreichender Menge vorhanden sind. Die Reaktionsansätze für die Reparaturreaktion wurden auf Eis zusammen pipettiert, gut durchmischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

## Reaktionsansatz:

---

50 $\mu$ g	<i>HEK293T</i> -Kernextrakt
5 $\mu$ g	Gesamtextrakt
2 $\mu$ l	Reparaturpuffer 10x
auf 100 mM	KCl
1 $\mu$ l	ATP 100 mM
35 ng	DNA-Substrat
auf 20 $\mu$ l	Aqua dest.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25  $\mu$ l Stopp-Lösung beendet. Es folgte eine weitere Inkubation von 15 min bei 37 °C. Dann erfolgte die Isolation des DNA-Substrates: Die Ansätze wurden mit TE-Puffer auf 150  $\mu$ l aufgefüllt, mittels Phenol-Chloroform-Extraktion Nukleinsäuren und Proteine voneinander getrennt und anschließend erfolgte die Ethanolpräzipitation der DNA. Zum Ansatz wurden 125  $\mu$ l Phenol (Roti-Phenol, Roth) gegeben, die Probe wurde gevortext und zentrifugiert (20000 g, 1 min), anschließend wurde der wässrige Überstand abgenommen, in frische Reaktionsgefäße überführt und mit 150  $\mu$ l Chloroform versetzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte eine DNA-Fällung des Überstands durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Ammoniumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol bei -20 °C für 30 min. Zur Fällungsreaktion wurde außerdem noch 1  $\mu$ l tRNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) hinzugegeben. Durch eine Zentrifugation (20000 g, 30 min, 4 °C) wurde die DNA sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation im Reaktionsansatz für die anschließende Hydrolyse mit EcoRV und AseI aufgenommen und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

## Reaktionsansatz:

---

1,5 $\mu$ l	NEB Puffer 3
0,15 $\mu$ l	BSA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l, NEB)
1 $\mu$ l	RNase A (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)
0,5 $\mu$ l	AseI
0,5 $\mu$ l	EcoRV
11,35 $\mu$ l	Aqua dest

Asel linearisiert das Substrat. Die Basenfehlpaarung des DNA-Substrats liegt in der Erkennungssequenz von EcoRV. Nur wenn die Reparatur erfolgt ist, kommt es zur Hydrolyse. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 1,5 µl DNA-Ladepuffer versetzt und im 2 %igen Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.2.11). Bei erfolgter Reparatur sind drei Fragmente entstanden, ein mit Asel linearisiertes Fragment und zwei weitere durch die Hydrolyse mit EcoRV. Zu einer vollständigen Hydrolyse mit EcoRV kommt es nicht, da die Reparaturreaktion mit den im Reparaturansatz enthaltenen Ligasen konkurriert. Zum Teil werden die Einzelstrangbrüche geschlossen, bevor eine Reparatur stattfinden kann. In Proben, in denen keine Reparatur erfolgte, entsteht nur ein Fragment.

Die Quantifizierung erfolgte mit den Programmen Quantity One (Bio-Rad) oder Image Lab (Bio-Rad). Die Banden wurden vermessen, der Anteil reparierten Substrates wurde ins Verhältnis zum nicht reparierten Substrat gesetzt und schließlich wurde die Reparatur von untersuchten Varianten relativ zur Positivkontrolle (MLH1 WT) angegeben.

Reparaturpuffer 10x:

Tris HCl pH 7,6	200 mM
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat	100 mM
dCTP (Sigma)	1 mM
dGTP (Sigma)	1 mM
dTTP (Sigma)	1 mM
ATP	30 mM
BSA (NEB)	0,5 mg / ml
Glutathion	10 mM

Die ATP-Stammlösung und die Glutathion-Stammlösung wurden zuvor mit NaOH neutralisiert.

Stopp-Lösung:

Proteinase K	90 µg / ml
EDTA	25 mM
SDS	0,7 %

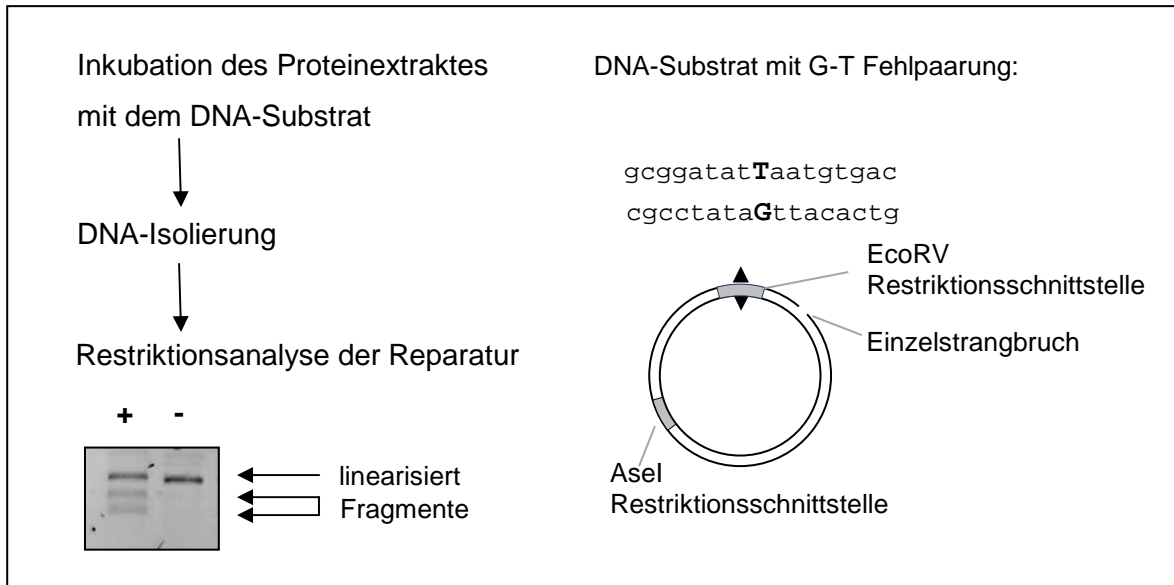


Abbildung 10: Ablauf des MMR-Assays. Der zu untersuchende Proteinextrakt wird mit dem DNA-Substrat und MLH1-defizientem Kernproteinextrakt inkubiert. Anschließend erfolgt die Isolierung der DNA mittels der Phenol-Chloroform-Methode. Der Erfolg der Reparatur wird mittels der Restriktion mit den Enzymen EcoRV und AseI kontrolliert. AseI linearisiert das Plasmid. Die Restriktion mit EcoRV kann nur erfolgen, wenn die Erkennungssequenz des Enzyms durch die *Mismatch*-Reparatur wieder hergestellt wurde.

### 2.2.26 THERMAL-SHIFT-ASSAY

Im *Thermal-Shift*-Assay wurde die Proteinstabilität anhand der thermischen Stabilität bestimmt. Die Temperatur, bei der sich das Protein entfaltet, wird anhand des Anstiegs der Fluoreszenz eines Farbstoffes mit einer Affinität zu hydrophoben Bereichen des Proteins bestimmt, die im Rahmen der Entfaltung vermehrt exponiert werden. Im Assay wurde Sypro Orange (Invitrogen) verwendet.

Zunächst kommt es zu einer basalen Fluoreszenz bei 492 nm. Bei der Auffaltung des Proteins werden hydrophobe Bereiche präsentiert, an die Sypro Orange bindet. Dies führt zu einer starken Fluoreszenz bei 610 nm. Nach dem Maximum der Fluoreszenz kommt es wieder zu einer Abnahme. Dies ist damit zu erklären, dass das Protein durch Aggregation und Ausfallen der Lösung entzogen wird. Die Fluoreszenz wird als Funktion der Temperatur beschrieben. Es folgt ein sigmoidaler Kurvenverlauf und mit der Boltzmann-Gleichung kann der Wendepunkt der Funktion berechnet werden. Die Methode wird häufig zur Untersuchung der Interaktionen von kleinen Liganden und einem Protein verwendet und wird auch als *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF) bezeichnet. Der Assay wurde für den Vergleich zwischen MLH1-Varianten und dem Wildtyp-Protein auf der Grundlage des Protokolls von Niesen et al. (2007) durchgeführt.

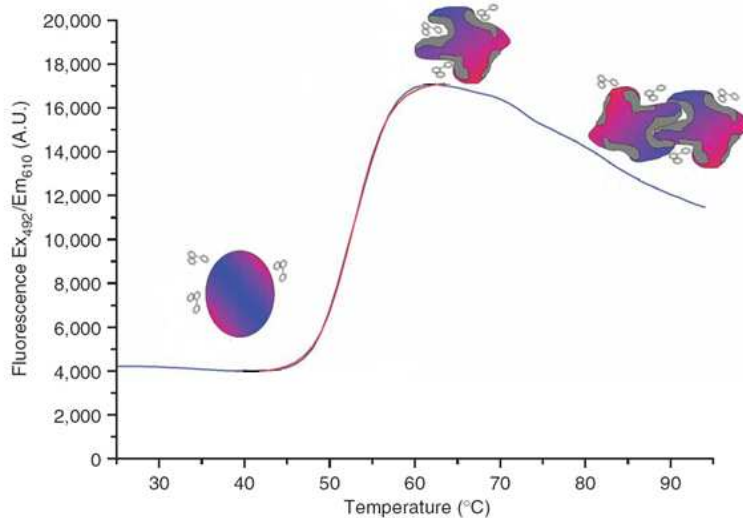


Abbildung 11: Typischer Verlauf der Fluoreszenzintensität für das Entfalten eines Proteins in Gegenwart von Sypro Orange. Durch den Anstieg der Temperatur werden hydrophobe Bereiche des Proteins präsentiert (in grau) und der Farbstoff, der an das Protein gebunden hat, emittiert Licht von 610 nm. Nachdem das Intensitäts-Maximum erreicht ist, nimmt die Fluoreszenz auf Grund von Aggregation und Präzipitation ab. Übernommen aus: (Niesen et al. 2007).

Für den Assay wurde aufgereinigtes Protein, das in Sf9-Zellen exprimiert wurde, verwendet (siehe 2.2.16.5). Die Reaktion wurde in 96-Well-Platten von Thermo (ThermoFast® 96 PCR Plate) mit den zugehörigen Folien (Absolute QPCR Seal) durchgeführt. In 10 µl Reaktionsansätzen wurden je 1,2 µM Protein mit 2,5 µl kaltem Syropuffer auf Eis vermischt. Für alle Proben wurden jeweils drei Ansätze vermessen. Der Syropuffer enthielt das Sypro Orange. Im Realtime-PCR-Gerät StepOnePlus (Applied Biosystems) wurden die Reaktionsansätze von 25 °C auf 75 °C auf geheizt. Die Fluoreszenz wurde bei 580 nm mit der Kalibrierung für TAMRA in 0,3 °C Schritten gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA). Für die Berechnung wurde ein Boltzmann sigmoidaler Kurvenverlauf angenommen und der Wendepunkt der Kurve bestimmt. Für den Vergleich der Varianten untereinander wurde die Verschiebung des x-Wertes des Wendepunktes (V50) der Variante im Verhältnis zu der des Wildtyps gesetzt.

#### Syropuffer 4x:

HEPES pH 7,5	40mM
NaCl	600mM
Sypro Orange	0,004 % (v/v)

### 2.2.27 PULSE-CHASE-ASSAY MIT *IN VITRO*-TRANSKRIPTION UND TRANSLATION

Dieser Assay wurde im Prinzip nach einem Protokoll für die Ermittlung des Proteinabbaus von *in vitro* synthetisierten Proteinen durchgeführt (Desviat et al. 2003) und das *TNT-T7 coupled transcription-translation system* (Promega) verwendet.

Die zu untersuchende MLH1-Variante wurde gemeinsam mit PMS2 im Retikulozytenlysat exprimiert, dazu wurden 20 ng DNA /  $\mu$ l Ansatz und  $^{35}$ S-Methionin zugefügt. Der Ansatz inkubierte 30 min bei 30 °C, anschließend erfolgte das Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von DNase, RNase und unmarkiertem Methionin. Durch die Zugabe von DNase und RNase wurde der Proteinexpression das Substrat entzogen, durch das unmarkierte Methionin ist gegebenenfalls neusynthetisiertes Protein nicht markiert. Nun wurde der Ansatz bei 37 °C inkubiert, zum Zeitpunkt 0 und nach weiteren Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit Ladepuffer (RotiLoad1, Roth) versetzt und bei -20 °C gelagert. Die Auswertung des Proteinabbaus erfolgte durch eine SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.2.19) und eine anschließende Autoradiographie (siehe 2.2.22).

Die Analyse des Proteinabbaus erfolgte unter der Annahme, dass der Abbau dem Verlauf einer Exponentialfunktion ( $c = c_0 * e^{-k*t}$ ) folgt.

$c$  = Konzentration

$c_0$  = Anfangskonzentration

$k$  = Abbaukonstante

$t$  = Zeitpunkt

Die Halbwertszeit (HWZ) wurde entsprechend mit  $HWZ = \frac{\ln 2}{k}$  berechnet.

Für die Berechnung der zugrundeliegenden Funktion wurde Microsoft Excel verwendet.

### 2.2.28 *IN SILICO*-STABILITÄTSANALYSE

Für die *in silico*-Analyse wurden unterschiedliche Computerprogramme verwendet, die im Internet frei verfügbar sind und verschiedene Algorithmen benutzen.

#### MAPP-MMR:

MAPP-MMR (Chao et al. 2008) ist eine Weiterentwicklung von MAPP (**M**ultivariate **A**nalysis of **P**rotein **P**olymorphism) (Stone and Sidow 2005) und für die Klassifizierung von MLH1- und MSH2-Varianten ausgelegt. MAPP benötigt ein Alignment und einen phylogenetischen Baum. Sowohl das Alignment von orthologen Proteinsequenzen als auch der phylogenetische Baum müssen vom Benutzer erstellt werden. Aus dem phylogenetischen Baum werden über die Zweiglängen (*branch length*) und die Topologie des Baums Gewichtungen für alle Sequenzen berechnet. Die Gewichtungen von

Sequenzen, die den untersuchten Aminosäureaustausch tragen, werden multipliziert. Außerdem berücksichtigt MAPP physiochemische Parameter wie Hydrophathie, Polarität, Ladung, Volumen der Seitenkette, sowie freie Energie in der Alpha-Helix oder im Beta-Faltblatt jeder Aminosäure.

In MAPP-MMR sind Alignment und Baum für MLH1 und MSH2 bereits hinterlegt, das entsprechende Protein wird ausgewählt (MLH1 oder MSH2) und der Aminosäureaustausch angegeben. Als Ergebnis wird der MAPP-MMR-Score berechnet. Der mittlere Wert für einen schädlichen Aminosäureaustausch liegt bei 16,5, der für VUS bei 10,8 und der für neutrale Varianten bei 3,5. Für Varianten mit einem MAPP-MMR-Wert von 3 bis 5 wurde eine Einordnung als grenzwertig empfohlen (Chao et al. 2008), da der Genauigkeitsgrad hier mit 88 % unter dem mit 94,6 % angegebenen Genauigkeitsgrad für andere Werte liegt.

Internetadresse: <http://mappmmr.blueankh.com/>

#### CUPSAT:

CUPSAT (**C**ologne **U**niversity **P**rotein **S**tability **A**nalysis **T**ool) verwendet für die Vorhersage des Einflusses eines Aminosäureaustausches Strukturinformationen. Die Berechnung erfolgt auf Basis einer PDB (ProteinDataBase)-Struktur (Parthiban et al. 2006), wobei sowohl in der Datenbank existierende PDB-Strukturen verwendet werden können als auch selbst erstellte.

Für die Vorhersage der Aminosäureaustausche im C-Terminus wurde das Modell von Kosinski et al. (2008) verwendet, für die Berechnung der Variante im N-Terminus das Modell von Plotz et al. (2006a). Der Server bietet zwei unterschiedliche Einstellungen: die Vorhersage thermischer oder chemischer Denaturierung. Für die Berechnung wurden das unterschiedliche Atompotential und der unterschiedliche Torsionswinkel der Varianten verwendet.

Internetadresse: <http://cupsat.tu-bs.de/>

#### PANTHER:

Mit dem Programm PANTHER (**P**rotein **A**nalysis **T**hrough **E**volutionary **R**elationships) (Thomas et al. 2003) erfolgt ein Alignment von evolutionär verwandten Proteinen. Nachdem Eingabe der Proteinsequenz und des gewünschten Aminosäureaustausches, wird das Ergebnis als subPSEC- (*substitution position-specific evolutionary conservation*) Wert ausgegeben. Der subPSEC-Wert nimmt Werte von 0 bis über -10 an, 0 bedeutet neutral, -10 höchstwahrscheinlich schädlich. Außerdem wird noch *Pdeleterious* angegeben, dieser Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass der getestete Aminosäureaustausch die Proteinfunktion beeinflusst und nimmt Werte von 0 bis 1 an. Ein

subPSEC-Wert von -3 entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 50 %, dass der untersuchte Aminosäureaustausch Einfluss auf die Proteinfunktion hat (Brunham et al. 2005; Thomas and Kejariwal 2004).

Internetadresse: <http://www.pantherdb.org/>

#### PolyPhen:

PolyPhen (**P**olymorphism **P**henotyping) (Ramensky et al. 2002) nutzt eine Vielzahl von unterschiedlichen Datenbanken und Programmen. Eingegeben wird die Aminosäuresequenz des Proteins oder die Nummer des Proteins in UniProt (*Universal Protein Database*) sowie die Position des Aminosäureaustauschs und die entsprechenden Aminosäuren. Zunächst sucht PolyPhen die Sequenz in der SWALL-Database und gleicht ab, ob Einträge zur Funktion vorhanden sind, wie z.B. Bindungsstelle oder Transmembrandomäne. Im nächsten Schritt werden unterschiedliche Programme genutzt, die solche Bereiche vorhersagen können, z.B. TMHMM für die Vorhersage von Transmembrandomänen. Anschließend wird nach bekannten Strukturen gesucht und abgeglichen, ob die untersuchte Aminosäure in Kontakt mit Bereichen bekannter Funktion steht. Gleichzeitig wird mittels BLAST nach homologen Sequenzen gesucht und ein Alignment erstellt. Dieses Alignment nutzt die PSIC (*position-specific independent counts*)-Software, um eine Matrix zu erstellen, die angibt, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass eine Aminosäure an einer bestimmten Position auftritt. PolyPhen berechnet den Unterschied zwischen den Werten der beiden Aminosäuren an der gewünschten Position. Zur Vorhersage wird die Differenz der ermittelten PSIC-Scores sowie Strukturinformationen genutzt, soweit diese vorhanden sind. Das Programm unterscheidet unkritisch (*benign*), eventuell schädigend (*possibly damaging*) und vermutlich schädigend (*probably damaging*). Eine Score-Differenz größer 2 führt zur Einordnung als vermutlich schädigend, eine Differenz zwischen 1 und 2 zur Einordnung als eventuell schädigend und eine Differenz kleiner 1 zur Klassifizierung als unkritisch. Inzwischen ist eine weiterentwickelte Version verfügbar: PolyPhen 2 (Adzhubei et al. 2010).

Internetadresse: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

#### SIFT:

SIFT (**S**orting Intolerant **F**rom Tolerant) benutzt Sequenzhomologien (Ng and Henikoff 2001). Der Algorithmus von SIFT setzt voraus, dass Proteinevolution und Proteinfunktion korrelieren. Für SIFT dbSNP Protein ist die Eingabe einer RefSeqID oder einer GI-Nummer notwendig, sowie die Angabe der Aminosäureaustausche, die berechnet werden sollen. Das Programm sucht zunächst nach ähnlichen Sequenzen, wählt dann Sequenzen, die eine ähnliche Funktion haben könnten, und berechnet ein Alignment. Aus



dem Alignment wird die Frequenz der einzelnen Aminosäure an dieser Position und dann die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten an dieser Position bestimmt. In die Berechnung geht auch der Rang ein, an dem eine Aminosäure liegt, wenn relative Raten für alle Aminosäuren nach BLOSUM62 (Henikoff and Henikoff 1992) berechnet werden und von hoch nach tief sortiert werden. Liegt der resultierende Wert unter 0,05 wird der Austausch als schädlich bewertet, liegt er darüber, als tolerierbar. Außerdem wird noch ein Wert angegeben, der über die Ungleichheit der Sequenzen Aufschluss gibt: *Median Info* kann Werte zwischen 0 und 4,32 annehmen und sollte zwischen 2,75 und 3,5 liegen.

Internetadresse: <http://sift.jcvi.org/>

### 2.2.29 VERNETZUNGEN VON PROTEINEN IM LYSAT

Um die Interaktion von MLH1 und PMS2 zu untersuchen, wurde das Vernetzungsreagenz BS<sup>3</sup> (Bissulfocuccinimidylsuberate, Thermo) verwendet. BS<sup>3</sup> ist ein homobifunktionaler N-hydroxysuccinimid Ester (NHS-Ester). NHS-Ester reagieren mit primären Amino-Gruppen (-NH<sub>2</sub>), so können interagierende Proteine über den N-Terminus oder die Seitenkette von Lysin verbunden werden.

Die Vernetzungsreaktion erfolgte im Proteinextrakt. Im 50 µl Ansatz wurden 25 µl Lysat mit 5 µl BS<sup>3</sup> versetzt (Endkonzentration von 5 mM) und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit Tris gestoppt (Endkonzentration 50 mM). Anschließend wurden die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.2.19) und Western Blot (siehe 2.2.20.1) ausgewertet oder für eine Coimmunopräzipitation (siehe 2.2.30) eingesetzt.

### 2.2.30 COIMMUNOPRÄZIPITATION

Um die Interaktion zwischen MLH1 und PMS2 zu untersuchen, wurde eines der Proteine mit einem Antikörper gefällt und anschließend detektiert, ob das andere Protein copräzipitierte.

Für die Coimmunopräzipitation wurden 200 µg Lysat in CoIP-Puffer aufgenommen und mit 1 µg Antikörper versetzt. Es wurden die Antikörper anti-hMLH1 (N-20, Santa Cruz Biotechnology) und anti-hPMS2 (A16-4, BD Biosciences) verwendet. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 4 °C, dann wurden 20 µl mit PBS gewaschene Protein G-Sepharose (Invitrogen) hinzugefügt, und eine weitere Inkubation von 3 h folgte. Dann wurde die Sepharose 3 x mit 400 µl CoIP-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 20 µl Ladepuffer (RotiLoad1, Roth) und das Erhitzen der Proben auf 90 °C für 3 min.

CoIP-Puffer:

Hepes pH 7,6	100 mM
NaCl	100 mM
EDTA	0,5 mM
PMSF	0,2 mM
DTT	1 mM
Triton Lösung	0,1 %
Aqua dest.	auf 500 µl

### 2.2.31 QUANTITATIVE *REAL TIME*-PCR

Die quantitative *real time*-PCR wurde verwendet, um die mRNA Menge der MLH1-Varianten zu bestimmen.

Zunächst erfolgte eine DNase-Behandlung der RNA-Proben (siehe 2.2.15). 2 µg RNA wurden im 10 µl-Ansatz für eine Stunde bei 37 °C mit der DNase behandelt. Anschließend erfolgte die Inaktivierung bei 65 °C für 10 min. Der Erfolg der DNase-Behandlung wurde mittels PCR überprüft. Für die reverse Transkription wurde zunächst die RNA mit den Oligonukleotiden (Random Primers, Promega) für 5 min auf 70 °C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von Reaktionspuffer, Nucleosidtriphosphaten und der reversen Transkriptase. Der Ansatz inkubierte 10 min bei Raumtemperatur und anschließend 50 min bei 50 °C. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Für diesen Assay wurde eine TaqMan-Sonde verwendet, die auf dem 5' Nuklease-PCR-Test beruht (Holland et al. 1991). Das Prinzip des Assay beruht auf der 5'→3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase. Es wird eine Sonde eingesetzt, die mit dem untersuchten Transkript hybridisiert. Die Sonde trägt am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff und am 3' Ende einen „Quencher“, der die Fluoreszenzemission des Reporters inaktiviert. Wenn die Taq-Polymerase in der PCR den Gegenstrang zum untersuchten Transkript synthetisiert, wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt. Durch die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs wird die Produktzunahme als Fluoreszenzzunahme detektierbar. Für die Ansätze wurden die DNA aus der reversen Transkription, der TaqMan PCR Mastermix (Applied Biosystems), die Sonde und die Oligonukleotide (siehe 2.1.3) auf Eis gemischt.

Die Emission der Fluoreszenz wurde im StepOnePlus *Real-Time*-PCR-Gerät (Applied Biosystems) gemessen.

Programm:

	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Aktivierung	50 °C	2 Minuten	1
Aktivierung der Taq	95 °C	10 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	55
Annealing/Elongation	60 °C	1 Minute	55

#### Relative Quantifizierung:

Als Kontrolle wurde das Transkript von *GAPDH* (Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) verwendet, um Schwankungen durch unterschiedliche Mengen RNA auszugleichen. Auf diese Kontrolle wird die Expression des Zielgens normalisiert. Für die Quantifizierung von *GAPDH* wurde eine Standard-Sonde (Hs99999905\_m1, Applied Biosystems) verwendet.

Die Transkriptmenge der MLH1-Varianten wurde relativ zum Wildtyp mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  - Methode berechnet. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR. Der CT-Wert (*threshold cycle*) gibt den Zeitpunkt der Amplifikation an, zu dem die Fluoreszenz die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übersteigt. Die CT-Werte der internen Kontrolle werden von den CT-Werten der Probe subtrahiert, so erhält man den  $\Delta CT$ -Wert. Von dieser Differenz wird schließlich der CT-Wert der Kalibratorprobe (also des Wildtyps) abgezogen. Mit dem resultierenden  $\Delta\Delta CT$  Wert wird die n-fache Expression berechnet:  $n = 2^{-\Delta\Delta CT}$ .

#### 2.2.32 FRAGMENTANALYSE

Zur Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität wurde die Länge zweier bekannter Mikrosatelliten per Fragmentanalyse bestimmt. Die Zellen wurden vereinzelt (siehe 2.2.12.6), so dass für die Fragmentanalyse Nachkommen einzelner Zellen getestet wurden. Aus diesen Zellen wurde DNA extrahiert (siehe 2.2.14) für die Amplifikation der Fragmente mittels PCR (siehe 2.2.8), wobei je eines der Oligonukleotide am 5'-Ende farbmarkiert war (siehe 2.1.4). Die Amplifikation wurde mittels eines Agarosegels überprüft und die Probe gereinigt. Anschließend wurden zu 1,5 µl Probe 0,5 µl ROX-Standard (Gene Scan 500 ROX Size Standard, Applied Biosystems) und 8,5 µl HID-Formamid (Applied Biosystems) gegeben.

Die Fragmentanalyse erfolgte mit dem Sequenzierer (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) mit dem *Gene-Mapper*-Modul, wobei die Länge des farbmarkierten Fragments gegen den Standard gemessen wird. Die Auswertung erfolgte mit der PeakScanner-Software.

### 2.2.33 PRÜFUNG AUF SIGNIFIKANZ: T-TEST

Zur Prüfung von Mittelwertunterschieden wurde der heteroskedastische t-Test verwendet. Es werden zwei Stichproben verglichen, deren Varianzen nicht gleich sein müssen. Bei Gleichheit der Mittelwerte nimmt der berechnete p-Wert den Wert 1 an, ein p-Wert kleiner 0,05 gibt an, dass die Mittelwerte signifikant unterschiedlich sind. Die t-Tests wurden mit Microsoft Excel berechnet.

### 2.2.34 SAMMELN KLINISCHER DATEN FÜR AUSGEWÄHLTE MLH1-VARIANTEN

Für ausgewählte Varianten wurde nach Fällen in der Literatur gesucht. Dazu wurde die InSight-Datenbank verwendet (Peltomaki and Vasen 2004) und die umfangreiche Auflistung von Referenzen zu einzelnen Varianten aus einer Publikation, in der die Ergebnisse vorangegangener Studien für eine Vielzahl von Varianten zusammengetragen wurden (Chao et al. 2008). Außerdem wurde in PubMed und über Google im Internet, jeweils mit dem entsprechenden Einbuchstaben-Code für den Aminosäurewechsel, mit dem Dreibuchstaben-Aminosäure-Code und mit dem entsprechenden Basenwechsel gesucht.

### 3 ERGEBNISSE

Für die Diagnose des Lynch-Syndroms ist die Identifizierung einer inaktivierenden Keimbahnmutation in einem der *Mismatch*-Reparatur-Gene nötig. Bei vielen in Patienten identifizierten Varianten kann jedoch keine Aussage über die Pathogenität getroffen werden. Dies gilt insbesondere für Missense-Mutationen, d.h. für Punktmutationen, die zur Veränderung einer einzelnen Aminosäure führen. Die Einschätzung der Pathogenität dieser Varianten ist häufig nur durch experimentelle Daten möglich, da meistens nicht genügend klinische Daten zu den einzelnen Varianten vorhanden sind, um diese zur Klassifizierung zu verwenden.

In dieser Arbeit wurden *MLH1*-Missense-Varianten untersucht. Zunächst wurde ein Screening von *MLH1*-Missense-Varianten durchgeführt. In diesem Screening wurden die Proteinexpression und die generelle Reparaturfähigkeit der Varianten analysiert. Auf der Basis des Screenings wurden anschließend Varianten ausgewählt, um die Dimerisierung von *MLH1* und *PMS2* zu untersuchen. In einem weiteren Teilprojekt sollte das Ausmaß von Einschränkungen der Proteinstabilität einzelner Varianten mit dem klinischen Bild korreliert werden.

#### 3.1 SCREENING VON *MLH1*-VARIANTEN

Zunächst wurde ein Screening, bestehend aus der Analyse der Proteinexpression und der Evaluierung der generellen Reparaturfähigkeit, durchgeführt. Für dieses Screening wurden 58 *MLH1*-Varianten ausgewählt. Alle untersuchten Varianten weisen eine Veränderung in der kodierenden Sequenz auf. Bis auf eine Ausnahme handelte es sich bei den untersuchten Varianten um Missense-Varianten, d.h. die Varianten enthalten, verglichen mit dem Wildtyp-Protein, einen Aminosäureaustausch. Die einzige Ausnahme bildete die Deletionsvariante Y750X, bei der durch eine Punktmutation ein Stoppcodon an Position 750 entsteht. Dadurch fehlen die letzten sieben Aminosäuren. Die meisten der getesteten Varianten wurden in Patienten identifiziert und der InSight-Datenbank (Peltomaki and Vasen 2004) entnommen. In Abbildung 12 ist die Lage der untersuchten Aminosäurewechsel im Protein dargestellt. Fast alle analysierten Aminosäurewechsel befinden sich in der N-terminalen oder in der C-terminalen Domäne. Diese beiden Domänen weisen hochkonservierte Bereiche auf, während der *Linker*, die verbindende interne Domäne, sehr viel flexibler ist.

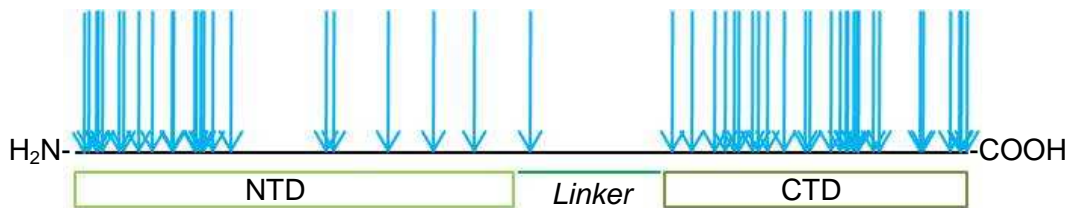


Abbildung 12: Verteilung der untersuchten Varianten im MLH1-Protein. Die meisten der untersuchten Varianten befinden sich in der N-terminalen Domäne (NTD) oder in der C-terminalen Domäne (CTD). Diese Bereiche sind stärker konserviert, als der flexible *Linker*, der die beiden Bereiche miteinander verbindet. In der N-terminalen Domäne ist die ATPase lokalisiert, in der C-terminalen Domäne befindet sich die Dimerisierungsfläche zu PMS2.

Die beiden Parameter Reparaturaktivität und Proteinexpression wurden für das Screening gewählt, da ein Defekt in einem dieser Parameter am wahrscheinlichsten die Ursache für die Pathogenität darstellt. Abgesehen von einer Ausnahme wurden ausschließlich Missense-Varianten untersucht, d.h. die Varianten weisen Punktmutationen in der kodierenden Sequenz auf, die lediglich zu der Veränderung einer Aminosäure im Protein führen. Daher ist es wahrscheinlich, dass die potentielle Pathogenität dieser Varianten auf der Proteinebene zu suchen ist und nicht auf RNA-Ebene. Mit der Reparaturaktivität wird die katalytische Funktion überprüft, mit der Expressionsanalyse die Verfügbarkeit des Proteins.

### 3.1.1 UNTERSUCHUNG DER PROTEINEXPRESSION

Zur Untersuchung der exprimierten Proteinmenge wurden die MLH1-Varianten zusammen mit dem MLH1-Dimerisierungspartner PMS2 transient in *HEK293T*-Zellen transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektion wurde ein Ansatz mit EGFP transfiziert, um so den Transfektionserfolg und die Effizienz der Transfektion mittels Fluoreszenz-Mikroskopie abzuschätzen. Die Zellen wurden im Anschluss geerntet, Proteinextrakte gewonnen und die Expression durch SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting analysiert. Das MLH1-Protein hat eine Größe von 84,6 kDa, das PMS2-Protein hätte nach seiner Aminosäuresequenz eine Größe von 95,8 kDa, in der Gelelektrophorese jedoch weist das Protein eine Größe von ca. 110 kDa auf. Diese Differenz wird durch posttranslationale Veränderungen des PMS2-Proteins verursacht (Raschle et al. 2002).

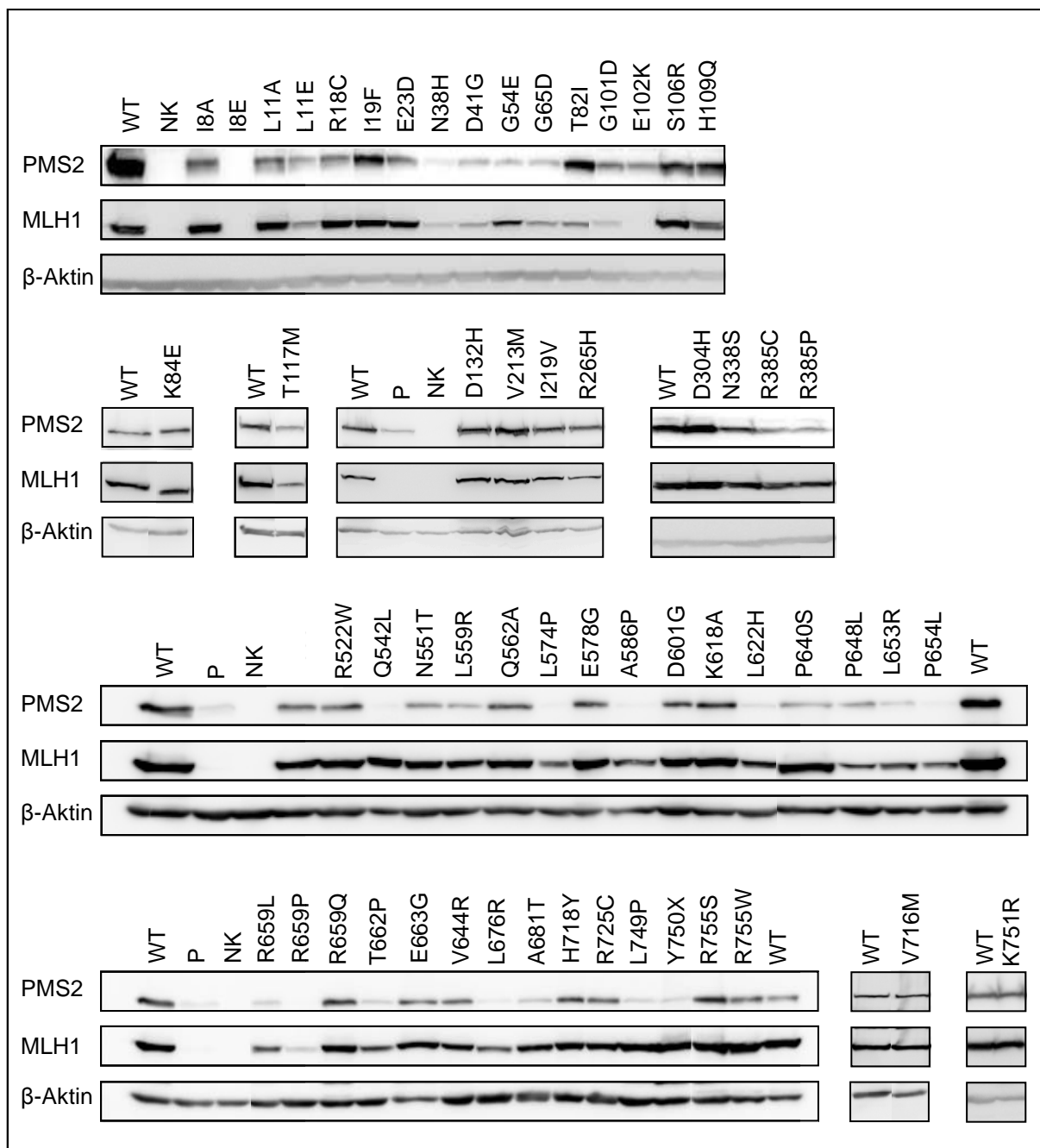


Abbildung 13 : MLH1-Expression der untersuchten MLH1-Varianten. *HEK293T*-Zellen wurden mit MLH1-Varianten in Kombination mit PMS2 transient transfiziert, anschließend wurden die Proteinmengen auf SDS-Gele mit anschließendem Western Blot über spezifische Antikörper detektiert. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgte mit dem Programm MultiGauge v3.2 relativ zur Menge von Wildtyp-MLH1. WT- Wildtyp-MLH1. NK- Negativkontrolle. P- nur PMS2 ohne gleichzeitige Transfektion mit MLH1. Alle Varianten sind mit der zugehörigen WT-Probe gezeigt.

In Abbildung 13 ist die Expression für alle untersuchten Varianten im Vergleich zum parallel transfizierten und analysierten Wildtyp gezeigt. Die Quantifizierung der MLH1-Expression der Varianten erfolgte relativ zur Expression des MLH1-Wildtyps. Die Kontrolle der Beladung der SDS-Gele erfolgte durch die Detektion von  $\beta$ -Aktin. Außerdem wurde

PMS2 detektiert. Für alle Varianten wurden drei bis vierzehn, unabhängige Experimente durchgeführt. In Tabelle A2 (Anhang) sind die gemessenen Expressionswerte zusammengestellt, sowie der Mittelwert (MW), die zugehörige Standardabweichung ( $\sigma$ ) und die Anzahl der in die Auswertung einbezogenen Werte (n). Außerdem wurde mit dem T-Test überprüft, ob die gemessene Expression signifikant unterschiedlich von der des Wildtyps ist. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde in der Tabelle außerdem angezeigt, ob der errechnete p-Wert unter 0,05 (\*) oder unter 0,01 (\*\*) liegt.

Die ermittelten Expressionswerte sind in Abbildung 14 im Diagramm dargestellt. Insgesamt zeigen viele Varianten eine vom Wildtyp abweichende Expression. Von den 58 untersuchten Varianten unterschied sich die Mehrheit vom Wildtyp, für 44 Varianten wurde eine signifikante Abweichung berechnet (p-Wert < 0,05).

Mehrere Varianten mit einem Austausch im N-terminalen Bereich zeigten eine MLH1-Expression, die deutlich über der des Wildtyps lag. Für die Varianten I8A, L11A, R18C, E23D, S106R, V213M und D304V wurden Expressionen über 120 % bestimmt. Andere Varianten mit einem Aminosäureaustausch im N-Terminus hingegen zeigten Expressionswerte unter 50 %: I8E, N38H, D41G, G65D, T82I, G101D, E102K und T117M.

Im C-Terminus zeigten die meisten Varianten eine verminderte Expression, nur die Varianten Q542L, D601G, E663G, L749P, Y750X, K751R und R755S wurden im Vergleich zum Wildtyp über 80 % exprimiert. Die Expression der Varianten L559R, L574P, L622H, P640S, P648L, L653R, P654L, R659L, R659L, T662P, V664R, L676R und R725C lag unter 50 %.



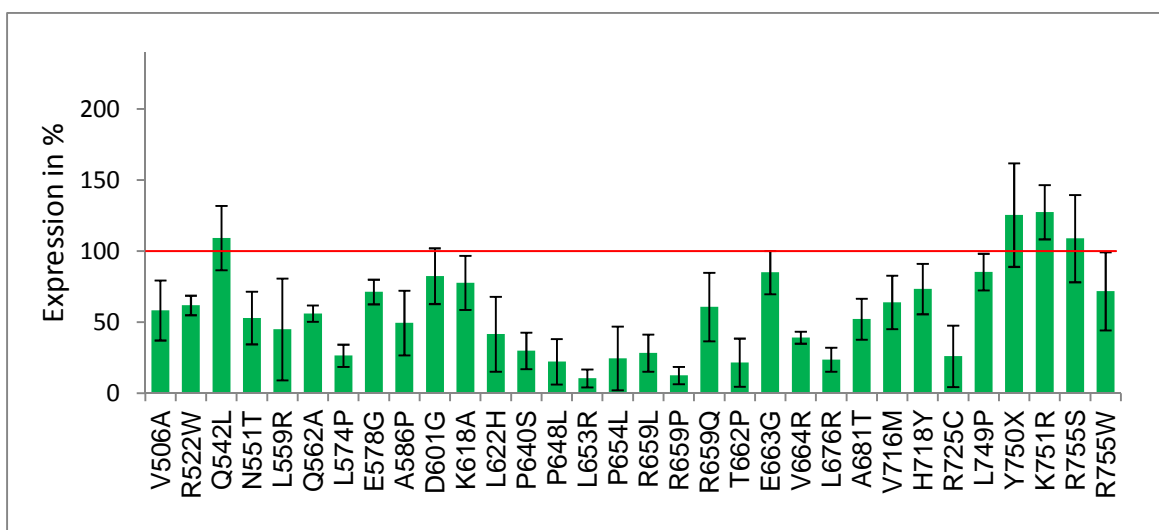
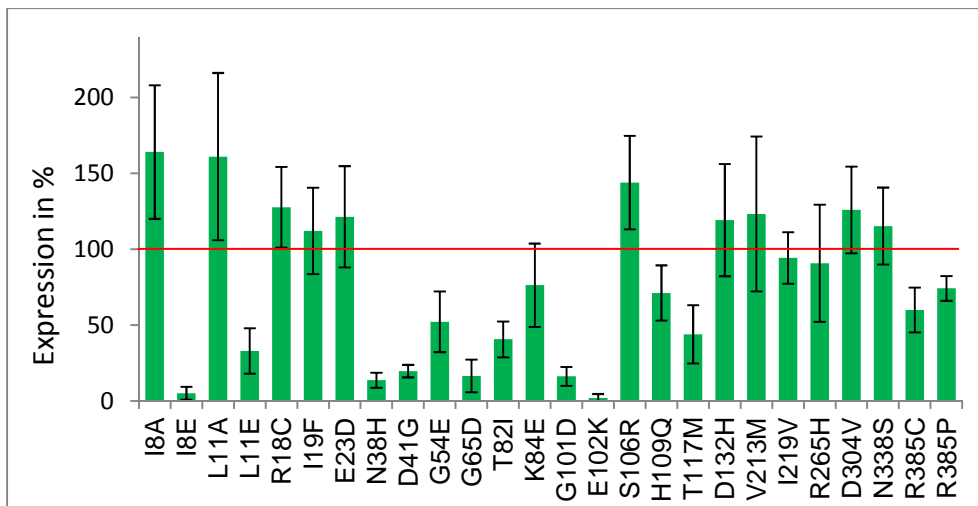


Abbildung 14: Zusammenfassung der MLH1-Expression der getesteten Varianten. Im Diagramm sind die Mittelwerte aller ermittelten Expressionswerte mit den zugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass viele MLH1-Varianten über eine veränderte Expression verfügen. Während bei Variationen im N-terminalen Bereich sowohl höhere als auch reduzierte MLH1-Mengen detektiert wurden, wurde für die Mehrzahl der Varianten mit einem Aminosäureaustausch im C-terminalen Bereich eine reduzierte Expression gemessen.

### 3.1.2 ANALYSE DER REPARATURFÄHIGKEIT

Neben der Expression der 58 Varianten wurde deren Reparaturaktivität untersucht. Die Proteinextrakte, die zur Bestimmung der Expression eingesetzt wurden, wurden auch für den MMR-Assay verwendet. Da im Assay der gesamte, komplexe Reparaturvorgang ablaufen muss, ist die Funktionsfähigkeit von MLH1 in vielen Teilbereichen nötig: z.B. in der Dimerisierung mit PMS2, in der Interaktion mit anderen Proteinen wie EXOI oder MutS $\alpha$  oder der ATPase-Aktivität.

Für den MMR-Assay wurde zu einem MutL $\alpha$ -defizienten Kernproteinextrakt, der sonst alle für die Reparatur notwendigen Faktoren enthält, das DNA-Substrat mit der zu reparierenden Fehlpaarung und ein Proteinextrakt, der die zu untersuchende MutL $\alpha$ -Variante enthält, gegeben. Eine erfolgreiche Reparatur erzeugt die Erkennungssequenz eines Restriktionszyms im DNA-Substrat, so dass dessen Hydrolyse eine Detektion der Reparatur ermöglicht (Abbildung 15). Die Auswertung der Reparaturfähigkeit erfolgte durch die Vermessung der Banden auf den Gelbildern. Zur Auswertung wurde der Anteil reparierter DNA zum Gesamtsignal ins Verhältnis gesetzt.

In jedem Assay wurde ein Ansatz mit dem Proteinextrakt der Zellen, die mit MLH1-Wildtyp transfiziert wurde, als Referenz und Positivkontrolle verwendet. Ein Ansatz mit dem Proteinextrakt der Zellen, die mit EGFP transfiziert wurden, diente als Negativkontrolle.

Der MMR-Assay wurde für alle Varianten zwischen zwei- und zehnfach durchgeführt und die Mittelwerte der Reparaturaktivität (MW) und die zugehörige Standardabweichung ( $\sigma$ ) wurden bestimmt. Außerdem wurde mit dem T-Test berechnet, ob die Reparaturaktivitäten der Varianten sich signifikant von der des Wildtyps unterscheiden (Tabelle A3, Anhang).

Während die detektierten Expressionsmengen den gesamten Bereich von kaum bis sehr stark exprimiert abdeckten, wurden keine mittleren Reparaturaktivitäten detektiert. Die Varianten zeigten volle Reparaturfähigkeit oder (fast) vollständigen Verlust (Abbildung 16).

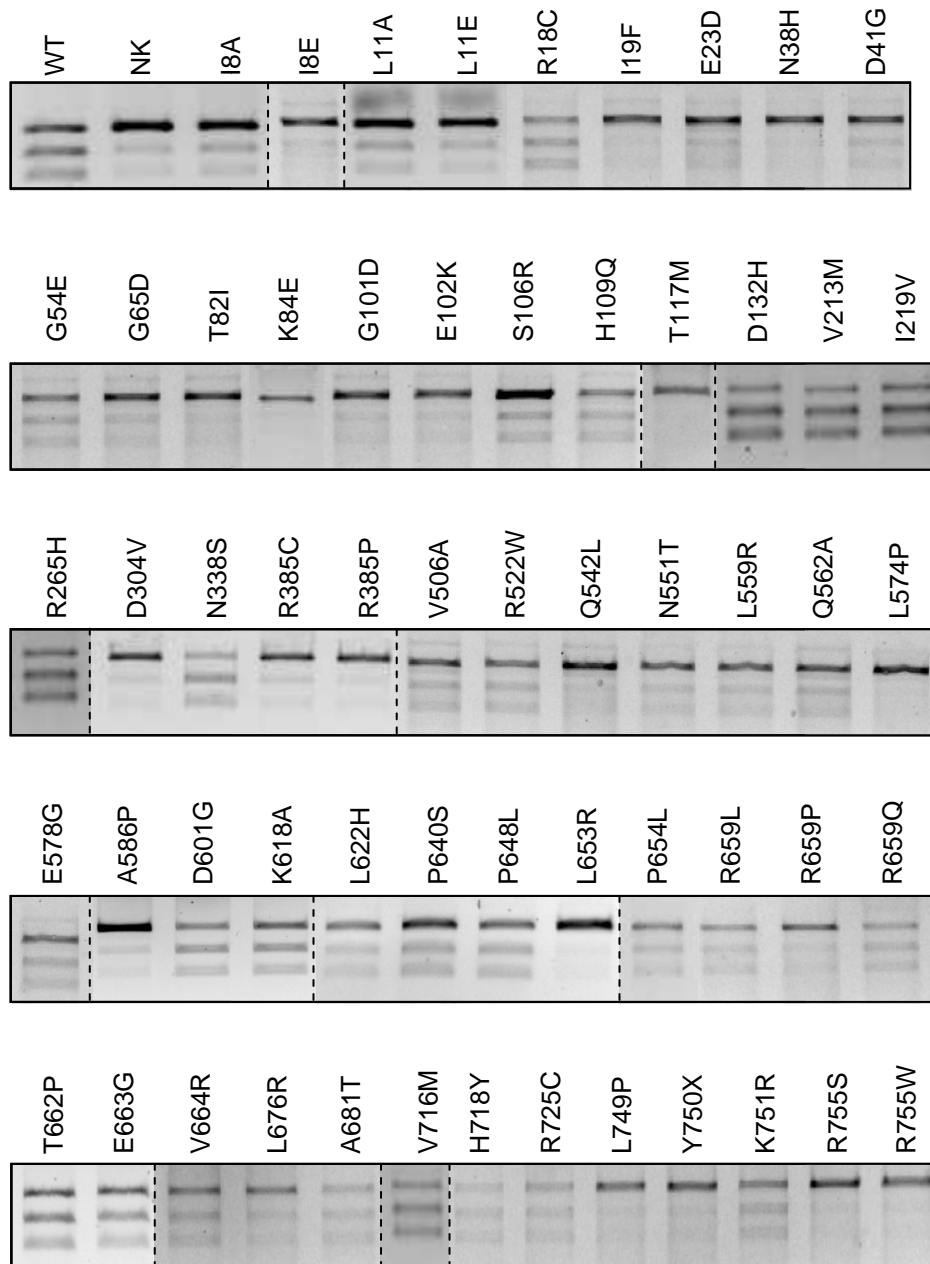


Abbildung 15: Reparaturaktivität der getesteten Varianten im MMR-Assay. Proteinextrakt von Zellen, die die untersuchte Variante exprimierten, wurde mit einem DNA-Substrat mit einer G-T-Fehlpaarung und Kernextrakt inkubiert. Anschließend wurde der Reparaturerefolg durch einen Restriktionsverdau überprüft. Während Asel das Substrat linearisiert, ist eine Hydrolyse mit EcoRV nur nach erfolgter Reparatur möglich. Dadurch entstehen bei erfolgreicher Reparatur drei Fragmente, bei Reparaturdefizienz nur ein Fragment. Auf einem Agarosegel wurden die entstandenen Fragmente sichtbar gemacht. Ein Assay mit Proteinextrakt von Zellen, die MutL $\alpha$ -Wildtyp exprimieren, diente als Referenz und Positivkontrolle (WT), eine Probe mit Extrakt von Zellen, die kein MutL $\alpha$  exprimieren, als Negativkontrolle (NK). Die Ergebnisse der einzelnen Varianten wurden für die Abbildung zusammengeschnitten, die Referenz (WT) und Negativkontrolle (NK) wurden nur einmal gezeigt.

Viele der Varianten, die einen Aminosäureaustausch im N-Terminus aufweisen (I8A bis R385P), zeigten eine geringe Reparaturaktivität. Die Varianten R18C, H109Q, D132H, V213M, I219V, R265H und N338S zeigen Reparaturaktivitäten über 70 %, für alle anderen Varianten wurden Reparaturaktivitäten unter 50 % bestimmt.

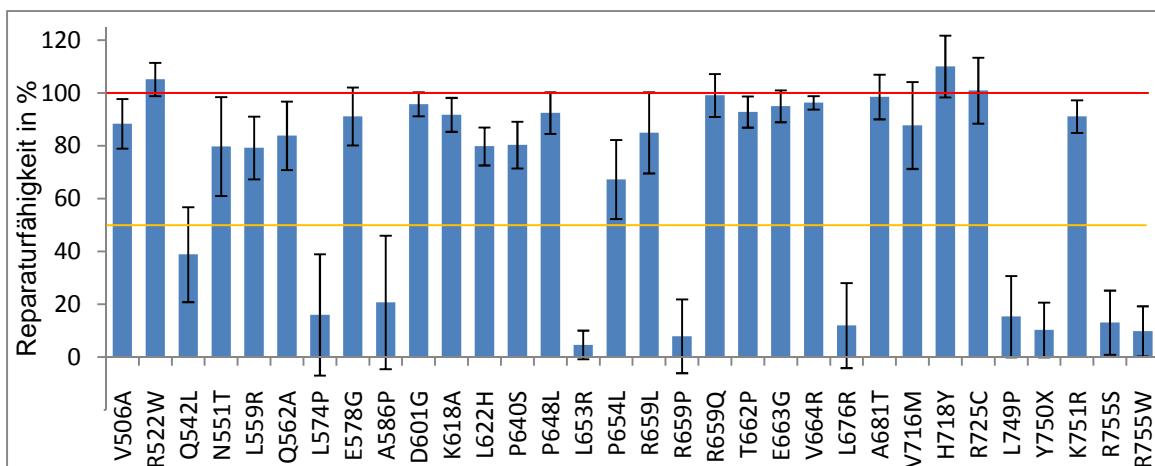
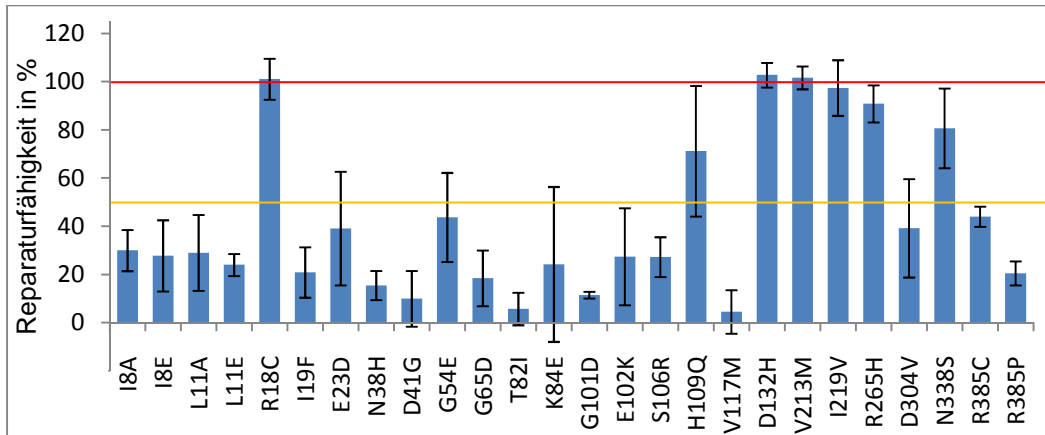


Abbildung 16: Übersicht über die Reparaturaktivitäten. Im Diagramm sind die Mittelwerte der Reparaturaktivitäten, die im MMR-Assay bestimmt wurden, zusammen mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt.

Die Varianten, die über einen Austausch im C-terminalen Bereich verfügen (V506A-R755W), wiesen fast alle hohe Reparaturaktivitäten auf. Lediglich die Varianten Q542L, L574P, A586P, L653R, R659P, L676R, L749P, X750X, R755S und R755W zeigten eine Reparatur unter 50 %.

Bei der Berechnung des T-Test wurde die Reparaturaktivität von 17 Varianten im C-Terminus als signifikant verschieden von der des Wildtyps bewertet. Neben den oben genannten Varianten traf dies auch auf V506A, L559R, Q562A, K618A, L622H, P640S und P654L zu, wenn auch bei sehr viel höheren Reparaturaktivitäten.

### 3.1.3 ZUSAMMENFASSUNG DES SCREENINGS

Das Screening von Expression und Reparaturfähigkeit der MLH1-Varianten zeigte, dass viele Varianten in ihrer Expression und/oder Reparaturfähigkeit verändert sind. Abbildung 17 zeigt ein Diagramm aus Reparaturaktivität und Expression, in das alle im Screening untersuchten Varianten eingetragen wurden.

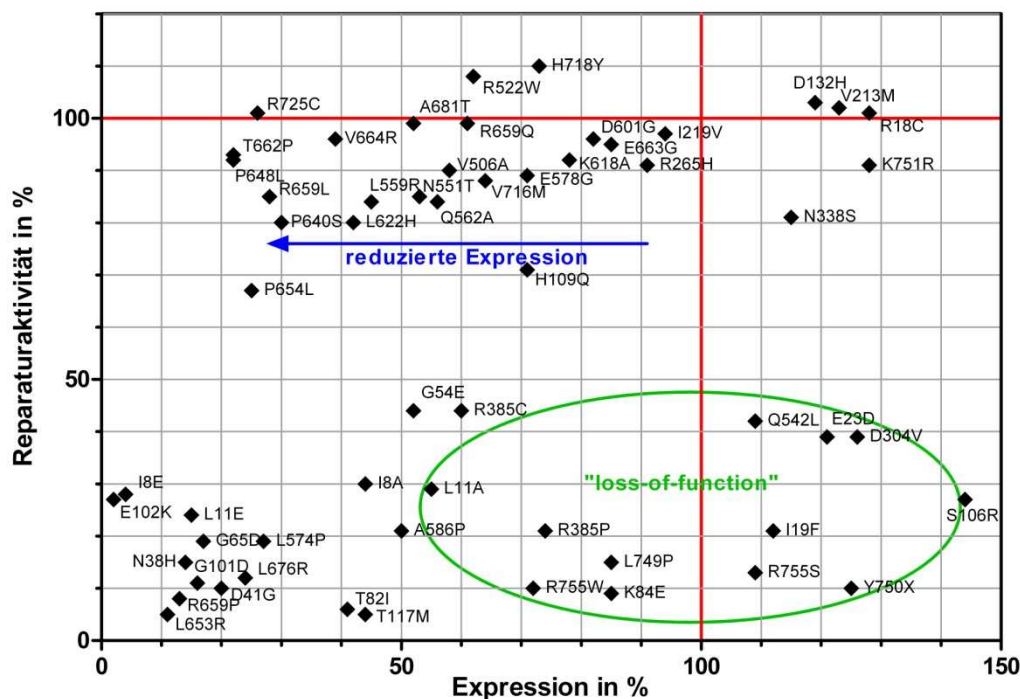


Abbildung 17: Zusammenfassung des Screenings der MLH1-Varianten. Die Varianten wurden in ein Koordinatensystem aus Reparaturaktivität und Expression eingetragen. Grün sind die „Loss-of-function“-Varianten markiert, die zwar eine hohe MLH1-Expression aufweisen, aber nicht über Reparaturfähigkeit verfügen. Mit einem blauen Pfeil sind die Varianten gekennzeichnet, die über hohe Reparaturaktivitäten, aber reduzierte Expression verfügen.

Die Varianten lassen sich mit Hilfe der Abbildung in unterschiedliche Gruppen einteilen: die erste Gruppe bilden Varianten, die über hohe Expressionswerte und hohe Reparaturaktivitäten verfügen. Eine zweite Klasse bilden Varianten, für die niedrige Expressionswerte und geringe Reparaturaktivitäten bestimmt wurden. Eine dritte Kategorie bilden die Varianten, die über hohe MLH1-Expression verfügen, jedoch über niedrige Reparaturaktivitäten. Varianten dieser Gruppe können als „loss-of-function“-Varianten eingeordnet werden. Die vierte Klasse wird von Varianten gebildet, die über hohe Reparaturaktivitäten verfügen aber unterschiedliche Mengen MLH1 aufweisen.

Varianten, die keine Reparaturaktivität zeigen, können als krankheitsauslösend klassifiziert werden. Die Ergebnisse des *Mismatch*-Reparatur-Assays können für die Klassifizierung von Varianten verwendet werden, da die Funktion dieser Proteine in der *Mismatch*-Reparatur bekannt ist und die Reparaturdefizienz als Auslöser des Lynch-Syndroms anerkannt ist (Goldgar et al. 2008). Es ist davon auszugehen, dass Varianten, die im MMR-Assay keine Aktivität zeigten, auch *in vivo* nicht aktiv sind.

Bei den Varianten hingegen, die über Reparaturfähigkeit verfügen, jedoch eingeschränkte Expression zeigten, kann nach diesem Screening keine Aussage über die Pathogenität getroffen werden. Um eine Klassifizierung dieser Varianten zu ermöglichen, muss die Frage beantwortet werden, welche MLH1 Expression für eine ausreichende Reparatur *in vivo* erreicht werden muss.

Eine weitere interessante Klasse von Varianten stellen die „*loss-of-function*“-Varianten dar, die Gruppe von Varianten, die gut exprimiert sind, jedoch keine Reparaturaktivität aufweisen. Diese Varianten weisen den Verlust einer Funktion des Proteins auf, somit kann ihre Untersuchung Rückschlüsse auf einzelne Funktionen des Proteins und Lokalisation von bestimmten Funktionen im Protein ermöglichen.

### 3.2 BILDUNG DES HETERODIMERS MUTL $\alpha$

Die Bildung des Heterodimers aus MLH1 und PMS2 ist essentiell für die Reparaturaktivität. PMS2 wird nur in Anwesenheit von MLH1 effizient exprimiert (Chang et al. 2000; Brieger et al. 2005; Mohd et al. 2006). Zellen, die kein MLH1 exprimieren, weisen fast kein PMS2-Protein auf, obwohl normale *pms2*-mRNA-Mengen detektiert wurden (Chang et al. 2000). Außerdem erfolgt ein gemeinsamer Import in den Zellkern (Wu et al. 2003; Brieger et al. 2005).

Die Dimerisierung von MLH1 und PMS2 sollte mit bereits im Screening betrachteten Varianten analysiert werden. Zunächst wurde ein natives Gel mit anschließendem Western Blot durchgeführt, um die Bildung von Wildtyp-MutL $\alpha$  zu untersuchen. Im nativen Gel sollen die Proteine in ihrer Konformation erhalten bleiben, so dass die Bildung eines Dimers im Western Blot nachweisbar ist.

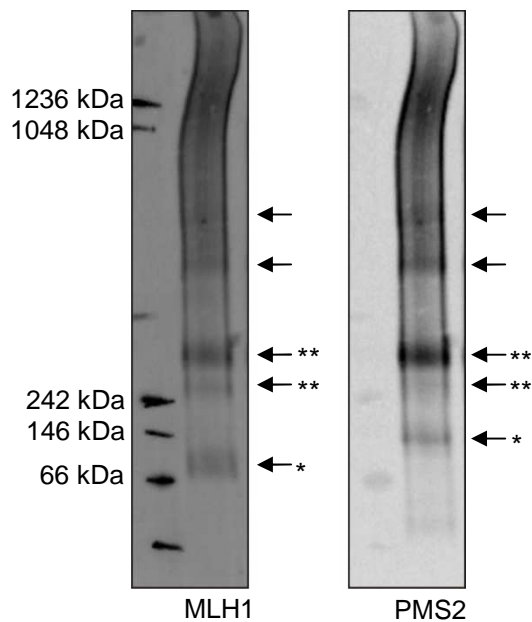


Abbildung 18: Abbildung des nativen Gels mit der Detektion von MLH1 und PMS2. Proteinextrakt von *HEK293T*-Zellen, transfiziert mit MutL $\alpha$ , wurde im nativen Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend wurden MLH1 und PMS2 detektiert. Die Detektion erfolgte mit Fluoreszenz-Zweitantikörpern, so dass beide Proteine gleichzeitig nachgewiesen werden konnten. Die Monomerbande für MLH1 und PMS2 wurde jeweils mit \* gekennzeichnet, die Dimerbanden mit \*\*. Weitere Banden, die für MLH1 und PMS2 detektiert werden konnten, wurden mit einem Pfeil markiert.

Neben den Monomerbanden für MLH1 und PMS2 wurden auch höher molekulare Komplexe detektiert (Abbildung 18). Die in Abbildung 18 mit Sternchen gekennzeichneten Pfeile markieren zwei Banden unterschiedlicher Größe, die vermutlich das Dimer repräsentieren. Zu den unterschiedlich großen Banden könnte es aufgrund von unterschiedlichen Konformationen des Dimers kommen. Es wurde gezeigt, dass MutL $\alpha$  zwischen vier verschiedenen Konformationen wechselt (Sacho et al. 2008). Die verschiedenen Banden könnten jedoch auch durch Anlagerung anderer Faktoren oder durch die Bildung von Oligomeren entstehen. Im höher molekularen Bereich wurden weitere Banden detektiert, die auf die Bildung von Tetrameren und größeren Aggregaten hinweisen könnten.

Zur Optimierung der Detektion der Dimerisierung wurde die Dimerbildung von MLH1 und PMS2 außerdem über die Vernetzung im Lysat untersucht. Das Vernetzungsreagenz BS<sup>3</sup>, das primäre Amine vernetzt, wurde zu Kernextrakt von *HEK293*-Zellen gegeben, um so Proteininteraktionen nachzuweisen (Abbildung 19).

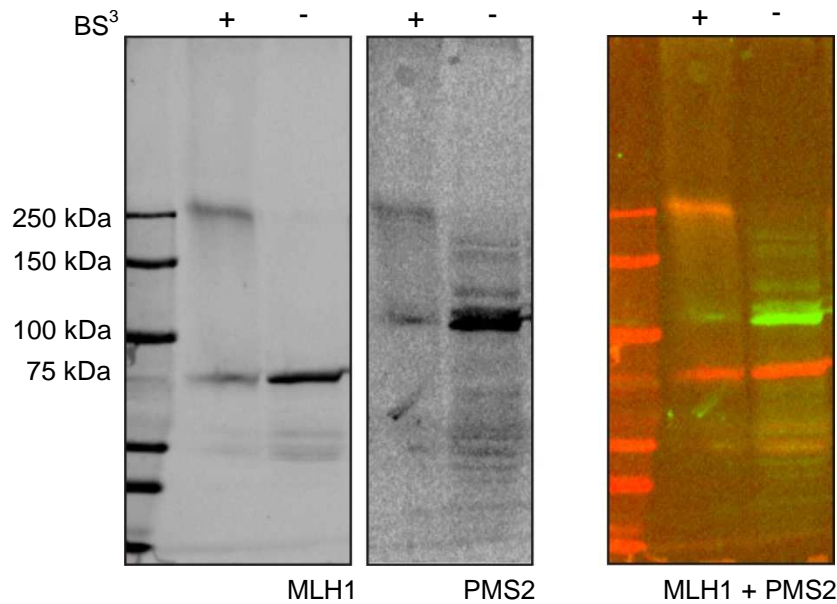


Abbildung 19: Vernetzung des endogenen MutL $\alpha$  im Proteinextrakt. Der Kernproteinextrakt von HEK293-Zellen wurde mit BS<sup>3</sup> inkubiert (+). BS<sup>3</sup> verbindet primäre Amine und ist so in der Lage, Proteine über die N-Termini oder Lysine zu vernetzen. Die Detektion der Proteine erfolgte nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot mit Fluoreszenz-Zweitantikörpern. Links ist die Detektion von MLH1 gezeigt, in der Mitte PMS2 und rechts PMS2 in grün und MLH1 in rot.

In der nicht behandelten Probe wurde sowohl für MLH1 als auch für PMS2 nur das Monomer detektiert. In der behandelten Probe wurden jeweils eine Monomer-Bande, die deutlich schwächer ist als in der unbehandelten Probe, und eine höher molekulare Bande nachgewiesen. Bei der größeren Bande handelt es sich um das Dimer aus MLH1 und PMS2. Dies wird dadurch deutlich, dass die Signale von MLH1 und PMS2 übereinander liegen.

### 3.2.1 UNTERSUCHUNG DER C-TERMINALEN DIMERISIERUNG MIT VARIANTEN AUS DEM SCREENING

Die konstitutive Dimerisierung von MLH1 und PMS2 erfolgt über die C-terminale Domäne (CTD) (Guerrette et al. 1999; Nystrom-Lahti et al. 2002; Plotz et al. 2003). Die strukturelle Grundlage dieser Dimerisierung wurde zu Beginn der Arbeit kontrovers beschrieben. Für yMutL $\alpha$  (MutL $\alpha$  aus Hefe) (Cutalo et al. 2006), das eng verwandt ist mit hMutL $\alpha$  und für das MutL-Homodimer aus *E.coli* (Guarne et al. 2004) wurde eine Dimerisierung mittels der „innenliegenden“ Subdomänen (*internal (In) subdomain*) vorgeschlagen. Kosinski et al. (2008) entwickelten ein Modell, das auf der Kristallstruktur des C-Terminus von MutL aus *E.coli* basiert, dessen Dimerisierungsfläche jedoch von „außenliegenden“ Subdomänen (*external (Ex) Subdomain*) von MLH1 und PMS2 gebildet wird. Die Kenntnis



der Lokalisation der Dimerisierungsfläche ermöglicht die Beurteilung der Pathogenität von Mutationen in diesem Bereich.

### 3.2.1.1 EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG DER DIMERISIERUNGSFLÄCHE

Um die Dimerisierung *in vitro* zu untersuchen, wurden 19 MLH1-Varianten aus dem Screening gewählt, deren Veränderung in einer der beiden vorgeschlagenen Dimerisierungsflächen, im angrenzenden Bereich oder außerhalb beider Bereiche im C-Terminus, lokalisiert sind (Abbildung 20). Die Varianten Q542L, L749P, Y750X, R755S und R755W weisen einen Aminosäureaustausch in der von Kosinski et al. beschriebenen „neuen“ Dimerisierungsfläche auf. Der Austausch N551T liegt im direkt angrenzenden Bereich. In der alternativen „alten“ Interaktionsfläche liegen die Veränderungen P648L, P654L und T622P. Die Varianten R659L, R659P, R659Q und E663G enthalten eine Alteration im direkt angrenzenden Bereich. Außerdem wurden noch die folgenden Varianten gewählt: L559R, A586P, D601G, K618A, L622H und P640S, deren Veränderungen im C-Terminus aber in keinem der beschriebenen Bereiche liegen.

Diese Varianten wurden zuvor auch von Chao et al (2008) bewertet. Zehn Veränderungen wurden als „die Proteinfunktion schädigend“ klassifiziert, sieben als unsicher (VUS) und eine als neutral. Die Deletionsvariante Y750X wurde von Chao et al. nicht betrachtet. In beiden vorgeschlagenen Dimerisierungsflächen liegen Austausche, die als VUS oder pathogen bewertet wurden.

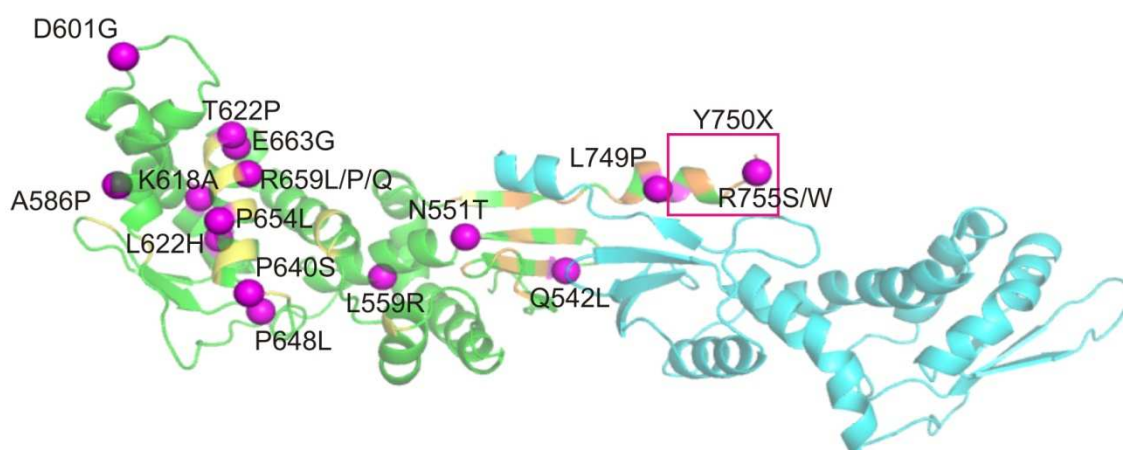


Abbildung 20: Ausgewählte Varianten für die Untersuchung der Dimerisierungsfläche. Die Abbildung beruht auf dem Modell von Kosinski et al. (2008): MLH1 ist grün, PMS2 blau. Die „alte“ Dimerisierungsfläche ist gelb eingefärbt, die „neue“ Interaktionsfläche orange. Die Varianten, die für die Untersuchung der Dimerisierung gewählt wurden, sind als Kugeln dargestellt (pink). Die Aminosäuren, die bei der Deletionsvariante Y750X fehlen, sind mit dem pinken Kasten markiert.

Bei der Betrachtung der Expressionswerte der Varianten (Abbildung 21, Tabelle A4, Anhang) fällt auf, dass sich nicht nur die MLH1-Expression, sondern auch die detektierte PMS2-Expression stark unterscheidet, obwohl gleiche Mengen des PMS2-Vektors transfiziert wurden.

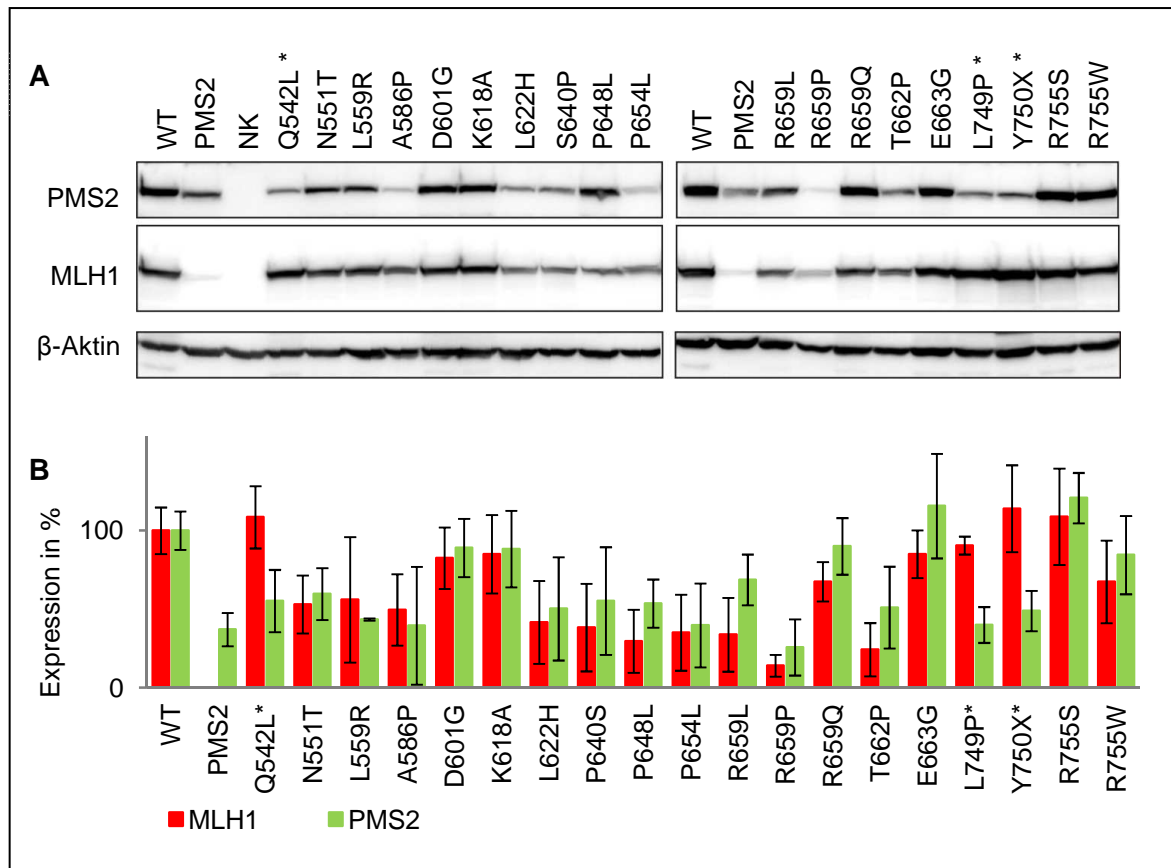


Abbildung 21: Expression von Varianten, deren Aminosäureaustausch in den potentiellen Dimerisierungsflächen liegt. MLH1 und PMS2 wurden in *HEK293T*-Zellen exprimiert, nach der Proteinisolierung wurden die Proteinmengen mittels Western Blot bestimmt. **A** Detektion der Proteinmenge.  $\beta$ -Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet. **B** Diagramm der Expression mehrerer Experimente. Die Proteinmengen wurden jeweils auf WT-MLH1 und WT-PMS2 bezogen und in % angegeben. Bei den mit \* markierten Varianten korrelieren MLH1- und PMS2-Mengen nicht.

Bei den meisten der getesteten Varianten entsprachen sich die Mengen von MLH1 und PMS2. Wurde ein hoher MLH1-Gehalt detektiert, wurde ebenfalls ein hoher PMS2-Gehalt bestimmt. Nur für drei der getesteten Varianten war dies nicht der Fall: die Variante Q542L, L749P und Y750X zeigten ein niedriges PMS2-Niveau, obwohl die MLH1-Expression der drei Varianten im Bereich der des Wildtyps lag (Abbildung 21, mit \* markiert). Die Reduktion der PMS2-Expression war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Die PMS2 Expression bei diesen drei Varianten entspricht der Expression von PMS2 in Abwesenheit von MLH1. Dies weist darauf hin, dass PMS2 hier nicht ausreichend von MLH1 stabilisiert wird.

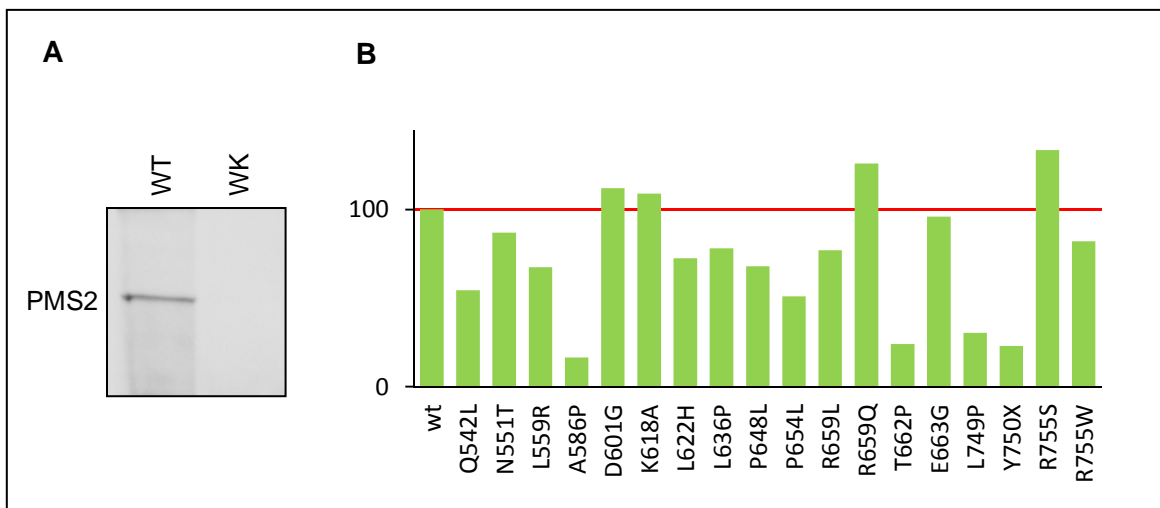


Abbildung 22: Coimmunopräzipitation von MutL $\alpha$ . MLH1 wurde mit dem Antikörper anti-hMLH1 (N-20, Santa Cruz Biotechnology), einem Antikörper, der den N-Terminus von MLH1 bindet, aus dem Extrakt gefällt. Die Menge des copräzipitierten PMS2 wurde mittels Western Blot nachgewiesen. **A** PMS2 copräzipitiert von MLH1-Wildtyp (WT). WK- Waschkontrolle, in diesem Ansatz wurde in der Coimmunopräzipitation kein Antikörper eingesetzt. **B** Diagramm der copräzipitierten PMS2-Mengen für die MLH1-Varianten, bezogen auf den Wildtyp (100%). Für die Variante R659P wurde auf die Coimmunopräzipitation verzichtet, weil die Expression dieser Variante sehr gering war.

Um den Einfluss der Varianten auf die Bildung des Heterodimers weiter zu analysieren, wurde gemessen, wie viel PMS2 mit MLH1 copräzipitiert wurde (Abbildung 22). Mit allen MLH1-Varianten wurde PMS2 copräzipitiert. Die Menge des gebundenen PMS2 korrelierte mit der Menge des exprimierten PMS2 (vergleiche Abbildung 21 und Abbildung 22), ein Defekt in der Bindung war somit nicht nachweisbar.

Da für drei Varianten gezeigt werden konnte, dass sie PMS2 nicht stabilisieren, jedoch in allen drei Fällen trotzdem PMS2 copräzipitiert wurde, wurden diese Varianten zusätzlich durch Vernetzung mit BS<sup>3</sup> analysiert (Abbildung 23).

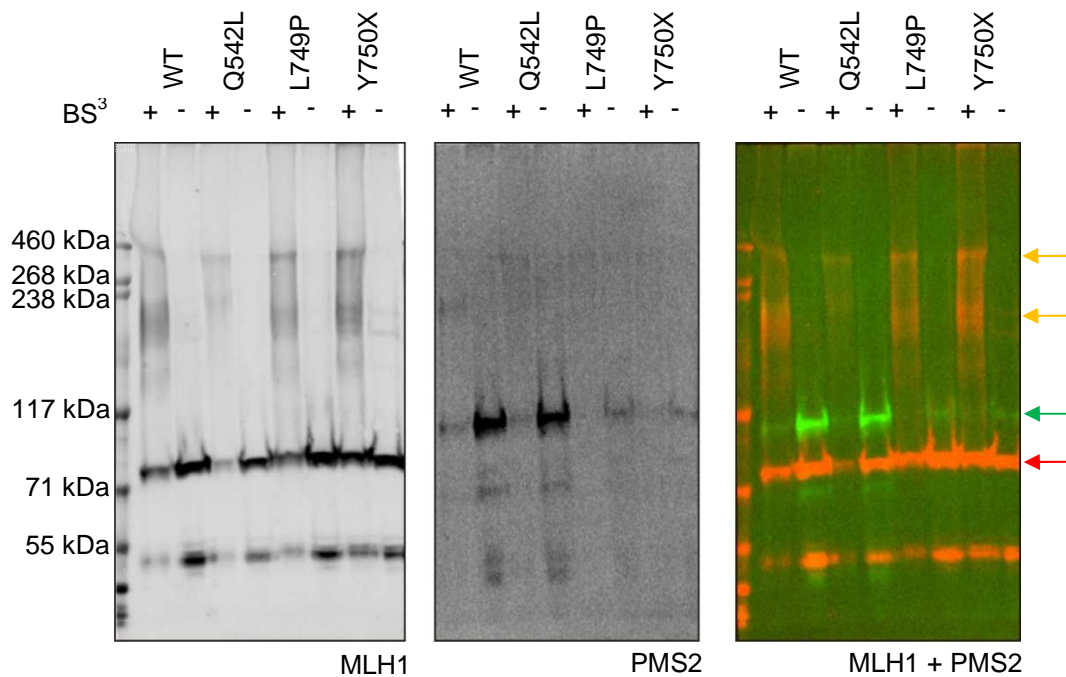


Abbildung 23: Vernetzung von MutLα und MutLα-Varianten im Lysat. MLH1 und die MLH1-Varianten wurden mit PMS2 in *HEK293T*-Zellen exprimiert. Ein Teil der Proteinextrakte wurde mit dem Vernetzungsreagenz BS<sup>3</sup> behandelt (+). Die Auswertung erfolgte über ein SDS-Gel mit anschließendem Western Blot. Aufgrund der Größe der erwarteten Vernetzungsprodukte wurde ein 3-8 %iges Tris-Acetat-Gel verwendet. Die Detektion von MLH1 und PMS2 erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern, so dass beide Proteine zeitgleich dargestellt werden konnten. In der linken Abbildung ist die Detektion von MLH1 gezeigt, in der mittleren die von PMS2 und in der rechten ist MLH1 in rot und PMS2 in grün abgebildet. MLH1-Monomer wurde mit einem roten Pfeil, PMS2-Monomer mit einem grünen Pfeil und die höher molekularen Banden mit einem gelben Pfeil gekennzeichnet.

Durch die Quervernetzung kam es bei allen Proben zu einer Abnahme des detektierten Monomers, sowohl für MLH1 als auch für PMS2. Gleichzeitig wurden in den behandelten Proben hochmolekulare Vernetzungsprodukte nachgewiesen. Die Signale der vernetzten Produkte waren für PMS2 (mittlere Abbildung) insgesamt schwächer. Die Abnahme der PMS2-Monomer-Banden in den mit BS<sup>3</sup> behandelten Proben wies jedoch darauf hin, dass auch PMS2 eine Interaktion eingeht.

Das Experiment wurde mit trunkierten MLH1-Proteinen wiederholt. Verwendet wurde eine MLH1-Variante, der die ersten 200 Aminosäuren fehlen (Plasmid pMLH1 200 Start). Die verkürzte Variante wurde gewählt, um auszuschließen, dass die Dimerisierung, die detektiert werden konnte, auf einer Interaktion der N-Termini beruht.

Obwohl es hier bei den Varianten zu einem deutlich schwächeren Dimer-Signal durch die Vernetzung der Extrakte kam als bei dem Wildtyp (Abbildung 24), lässt sich dies aufgrund der insgesamt schwächeren PMS2-Expression nicht als Interaktionsdefekt interpretieren. Für die Varianten wurde außerdem noch eine MLH1-Bande der Höhe des PMS2 Signals detektiert (markiert mit einem schwarzen Pfeil). Dabei könnte es sich um die Bildung eines MLH1-Homodimers handeln.

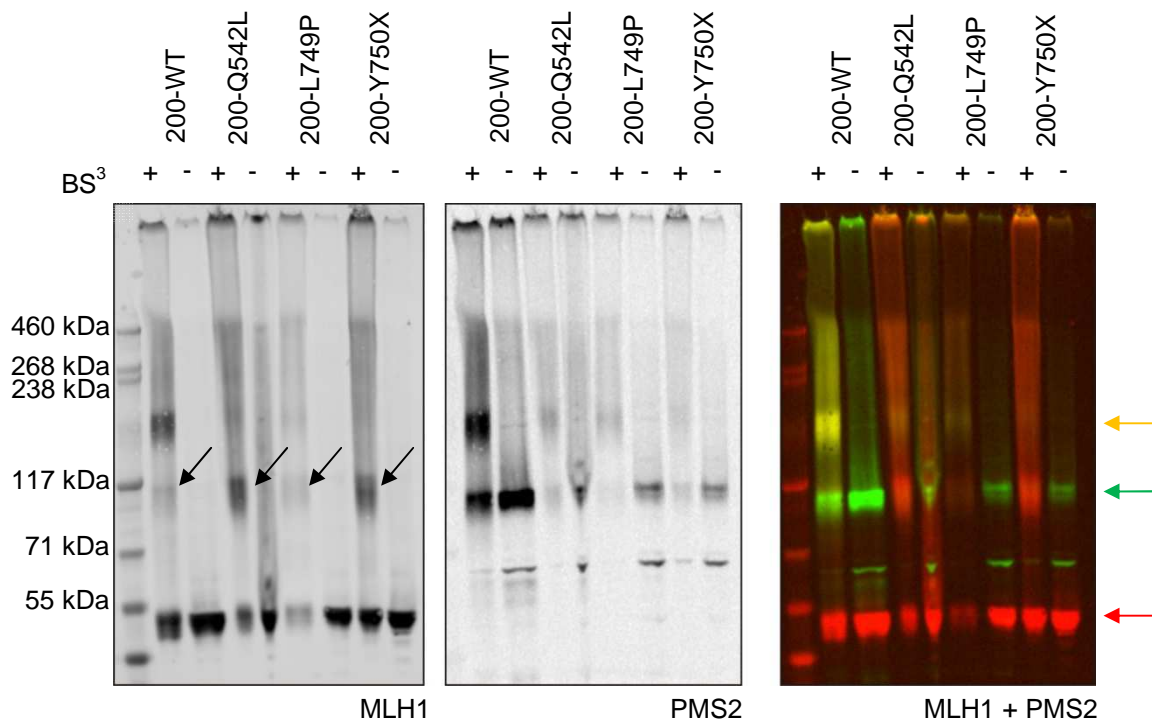


Abbildung 24: Interaktion des MLH1-C-Terminus mit PMS2. Verschiedene MLH1-200Start-Varianten, denen die ersten 200 Aminosäuren fehlen, wurden gemeinsam mit PMS2 in *HEK293T*-Zellen exprimiert. Die Lysate wurden mit  $BS^3$  behandelt (+) und die Vernetzung von MLH1 und PMS2 wurde mittels Western Blot detektiert. Zum Vergleich wurde jeweils eine unbehandelte Probe aufgetragen. In der linken Abbildung wurde MLH1 detektiert, in der Mitte PMS2 und im rechten Bild wurde PMS2 in grün dargestellt und MLH1 in rot. Die MLH1-200Start-Monomerbande ist mit einem roten Pfeil, PMS2-Monomer mit einem grünen Pfeil und die Dimerbande mit einem gelben Pfeil gekennzeichnet. Die Entstehung von MLH1-Homodimeren wurde mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Die drei Varianten Q542L, L749P und Y750X stabilisieren PMS2 nicht ausreichend. Obwohl MLH1 in allen drei Fällen gut exprimiert war, waren die entsprechenden PMS2-Mengen sehr niedrig. Diese fehlende Stabilisierung resultiert in einer Einschränkung der Reparaturaktivität (Tabelle 2). Alle drei Veränderungen liegen in der von Dr. Jan Kosiński vorgeschlagenen Dimerisierungsfläche. Keine der Varianten, die einen

Aminosäurewechsel in der anderen potentiellen Dimerisierungsfläche aufweisen, zeigte einen Defekt in der Stabilisierung.

Tabelle 2: Übersicht der Ergebnisse der Varianten, die für die Untersuchung der Dimerisierungsfläche verwendet wurden. Neben der Klassifizierung nach Chao et al. wurde für die Varianten angegeben: die Expression: \*\*\* >70 %, \*\* 30% - 70 %, \* 0% - 30%, die Stabilisierung von PMS2: k.A. keine Aussage möglich aufgrund der geringen MLH1-Expression und die MMR-Aktivität: \*\*\*>70 %, \*\* 30-70%, \*0-30%. Die drei Varianten, für die ein Defekt in der PMS2-Stabilisierung gefunden wurde, sind rot markiert.

Variante	Klassifizierung nach Chao	Ergebnisse der Experimente		
		Expression	PMS2 Stabilisierung	MMR Aktivität
<b>Q542L</b>	<b>VUS</b>	<b>***</b>	<b>-</b>	<b>**</b>
N551T	Del	**	k.A.	***
L559R	Del	**	k.A.	***
A586P	VUS	**	k.A.	*
D601G	Del	***	+	***
K618A	VUS	***	+	***
L622H	Del	**	k.A.	***
S640P	VUS	**	k.A.	***
P648L	Del	*	k.A.	***
P654L	Del	*	k.A.	**
R659L	Del	*	k.A.	***
R659P	Del	*	k.A.	*
R659Q	Neutral	**	+	***
T662P	VUS	*	k.A.	***
E663G	VUS	***	+	***
<b>L749P</b>	<b>Del</b>	<b>***</b>	<b>-</b>	<b>*</b>
<b>Y750X</b>	<b>-</b>	<b>***</b>	<b>-</b>	<b>*</b>
R755S	Del	***	+	*
R755W	VUS	***	+	*

### 3.2.1.2 BIOINFORMATISCHE ANALYSE DER DIMERISIERUNGSFLÄCHE

Die beiden potentiellen Dimerisierungsflächen wurden in Kooperation mit Dr. Jan Kosiński (Warschau, Polen) bioinformatisch analysiert (siehe Abbildung 25). Zunächst wurde die Oberflächen-Konservierung von MHL1, PMS2 und dem MutL Monomer aus *E.coli* in diesen Bereichen betrachtet. Dazu wurde die Konservierung zwischen homologen Proteinen auf die Moleküloberfläche projiziert. Während die außenliegenden Subdomänen konserviert sind, was typisch ist für Protein-Protein-Interaktionen (Valdar and Thornton 2001), trifft das für die innenliegenden Subdomänen nicht zu. Außerdem zeigen die außenliegenden Domänen einen stark hydrophoben Bereich, eine Eigenschaft die häufig in Dimerisierungsflächen auftritt (Nooren and Thornton 2003; Tsai et al. 1997; Young et al.



1994). Die andere vorgeschlagene Dimerisierungsfläche, aus den innenliegenden Subdomänen, enthält keinen solchen hydrophoben Bereich. Das Ergebnis der bioinformatischen Analyse weist daraufhin, dass die Dimerisierungsfläche von MutL $\alpha$  von den außenliegenden Subdomänen gebildet wird und somit die folgende Bereiche umfasst: die Aminosäuren 531-549 und 740-756 in MLH1 und die Positionen 679-699 und 847-862 in PMS2.

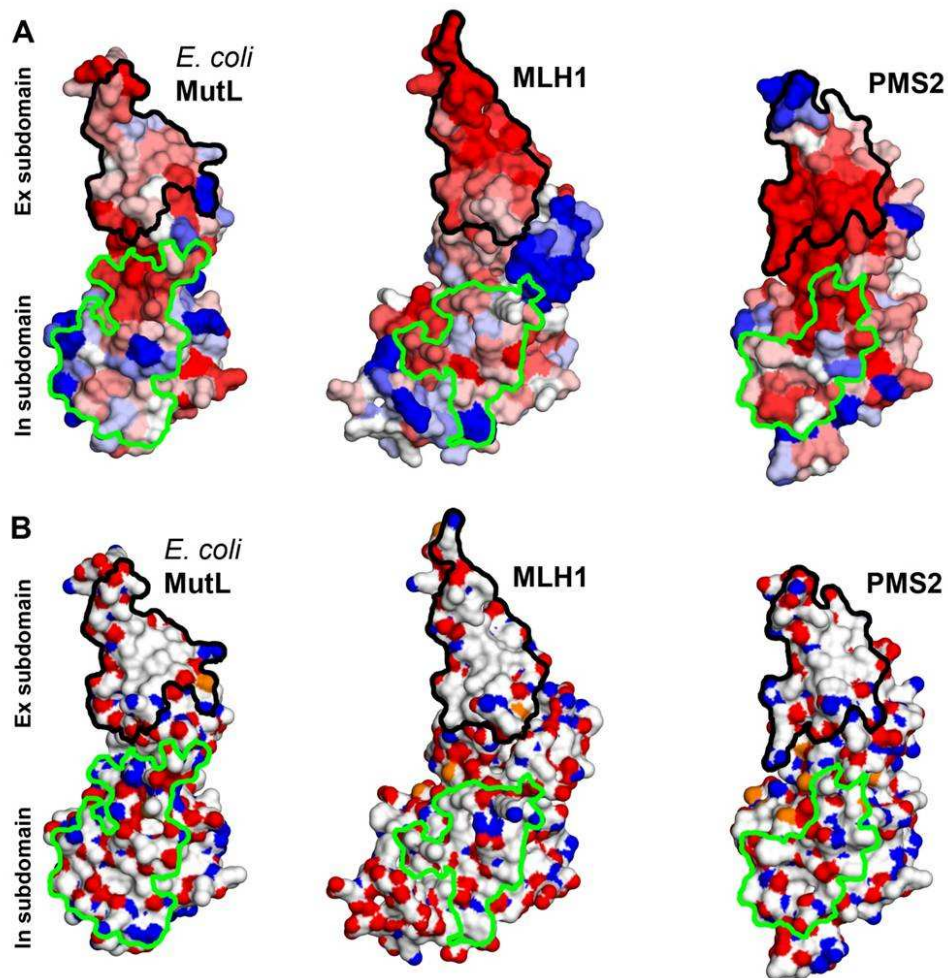


Abbildung 25: Analyse der Dimerisierungsflächen von MutL (*E.coli*) und den humanen Homologen MLH1 und PMS2. **A** Darstellung der Konservierung auf den Moleküloberflächen von MutL, MLH1 und PMS2. Farbgradient von blau=variabel zu rot=konserviert. Die neuvorgeschlagene Dimerisierungsfläche ist in A und B schwarz umrandet, die „alte“ vorgeschlagene für *E.coli* (Guarne et al. 2004) und für Hefe (Cutalo et al. 2006) ist grün umrandet. In **B** ist die Moleküloberfläche nach den Atomtypen eingefärbt: Kohlenstoffatome - grau, Sauerstoff - rot, Stickstoff - blau und Schwefel - orange.

### 3.3 UNTERSUCHUNG DER VERMINDERTEN EXPRESSION VON MLH1-VARIANTEN

Viele der untersuchten Varianten weisen reduzierte MLH1-Proteinexpression bei weitgehend unveränderter Reparaturfähigkeit auf. Um die Pathogenität einer Variante aufgrund ihrer reduzierten Proteinexpression zu beurteilen, muss die minimal nötige MLH1-Expression klinisch validiert werden. Zunächst wurde jedoch untersucht, worauf die verminderte Expression der MLH1-Varianten basiert.

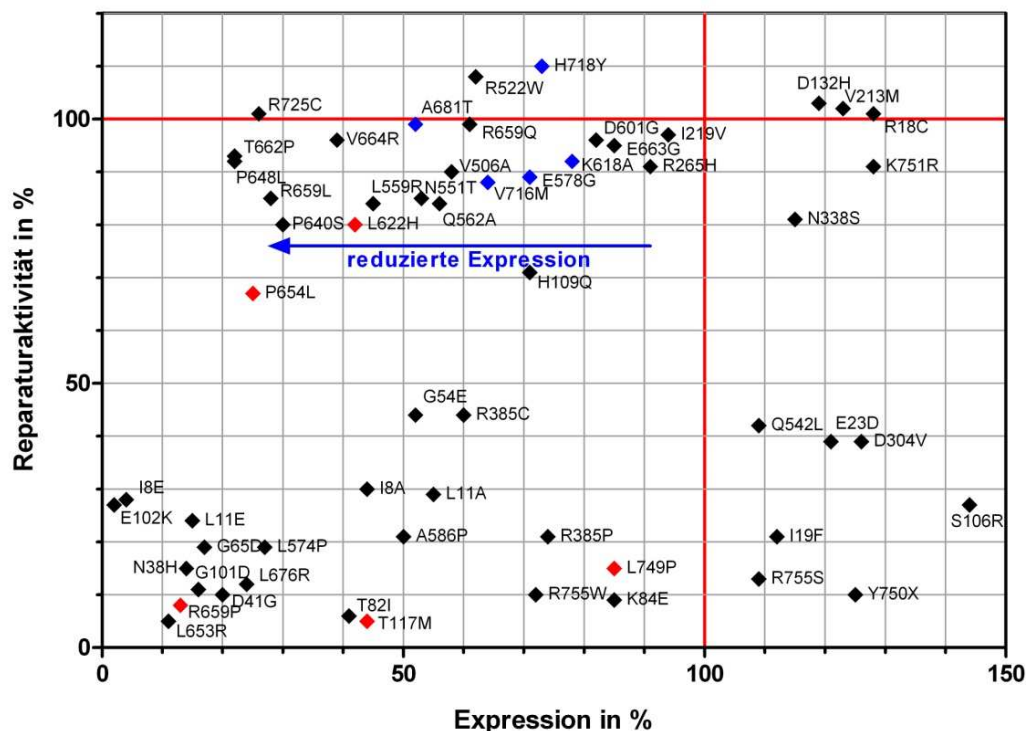


Abbildung 26: Auswahl der MLH1-Varianten für die Analyse reduzierter Proteinexpression. Die in blau dargestellten Varianten wurden für die weitere Untersuchung verwendet, die rot markierten Varianten dienten als pathogene Vergleiche.

Für die weitere Analyse der reduzierten Expression wurden verschiedene MLH1-Varianten ausgewählt (Abbildung 26), die im Screening hohe Reparaturaktivitäten zeigten und unterschiedlich reduzierte Expression aufwiesen: A681T, V718M, E578G, H718Y und K618A. Die Varianten L622H, P654L, R659P, T117M und L749P wurden als pathogene Kontrollen verwendet. Für die Variante L622H wurde eine gemäßigte Penetranz, aufgrund von reduzierter Stabilität, beschrieben (Borras et al. 2010). Das bedeutet, dass es bei Trägern dieser Variante seltener oder in höherem Alter ein Tumor entsteht.

Die Varianten mit der unterschiedlichen Expression sind in blau dargestellt. Diese Varianten weisen alle eine MLH1-Expression auf, die sich signifikant von der des Wildtyps



unterscheidet. Für diese Varianten wurden hohe Reparaturaktivitäten zwischen 88 % und 110 % ermittelt. Lediglich für den Mittelwert, der für die Reparaturaktivität von K618A bestimmt wurde, wurde ein p-Wert berechnet, der kleiner ist als 0,05. Bei einer Reparaturaktivität von 92 % kann jedoch von voller Reparaturaktivität ausgegangen werden.

### 3.3.1 ERMITTLUNG DER GEBILDETEN mRNA-MENGEN

Zunächst wurden die mRNA-Mengen der ausgewählten Varianten untersucht, um auszuschließen, dass die unterschiedlichen MLH1-Expressionswerte auf verschiedenen mRNA-Mengen beruhen. Die mRNA-Mengen wurden mittels quantitativer *real time*-PCR ermittelt.

Als zu amplifizierender Bereich wurde für die PCR ein MLH1-Fragment von 71 bp gewählt. Der Bereich, in dem die Sonde hybridisiert, reicht über die Exon-Grenze von Exon 12 zu Exon 13. So wurde sichergestellt, dass keine genomische DNA amplifiziert werden kann. Außerdem liegt in diesem Bereich keine der Varianten aus dem Screening, so dass diese Sonde für die Untersuchung aller getesteten Varianten geeignet wäre. Zunächst erfolgte eine Kalibrierung, um zu zeigen, dass die Amplifikation der Matrize exponentiell verläuft (siehe Abbildung 27).

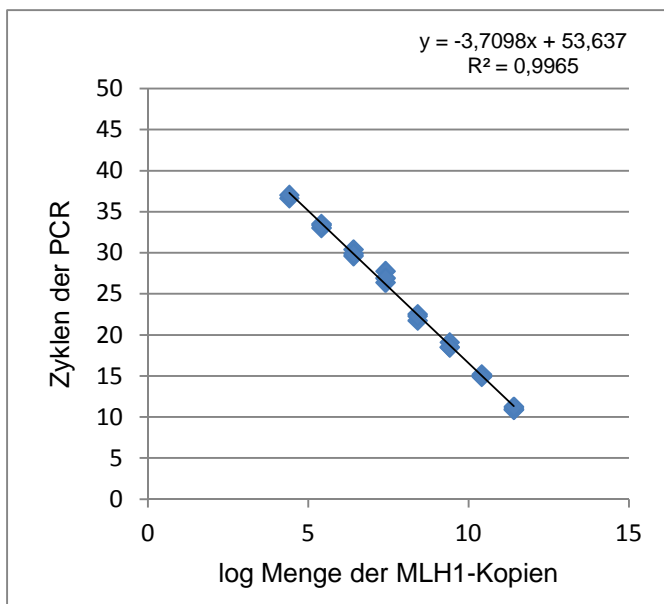


Abbildung 27: Kalibrierung der quantitativen *real time*-PCR. 10-fach Verdünnungen des Plasmids pMLH1 wurden in der quantitativen *real time*-PCR eingesetzt. In der semilogarithmischen Darstellung ist die Anzahl der eingesetzten MLH1-Kopien gegen den Zyklus, in dem die Fluoreszenz des durch die Reaktion freigesetzten Farbstoffs über das Hintergrundsignal stieg, aufgetragen. Der exponentielle Verlauf erscheint in der semilogarithmischen Ansicht linear.  $R^2$  ist das Bestimmtheitsmaß.

Die aus *HEK293T*-Zellen, die die untersuchte Variante und PMS2 exprimierten, isolierte RNA wurde mit DNase behandelt, um Kontaminationen mit Plasmid-DNA auszuschließen. Nach der reversen Transkription wurden die Proben für die quantitative *real time*-PCR eingesetzt. Der Faktor, mit dem sich die mRNA-Menge der Variante von der des Wildtyps unterscheidet wurde mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  – Methode berechnet (Abbildung 28).

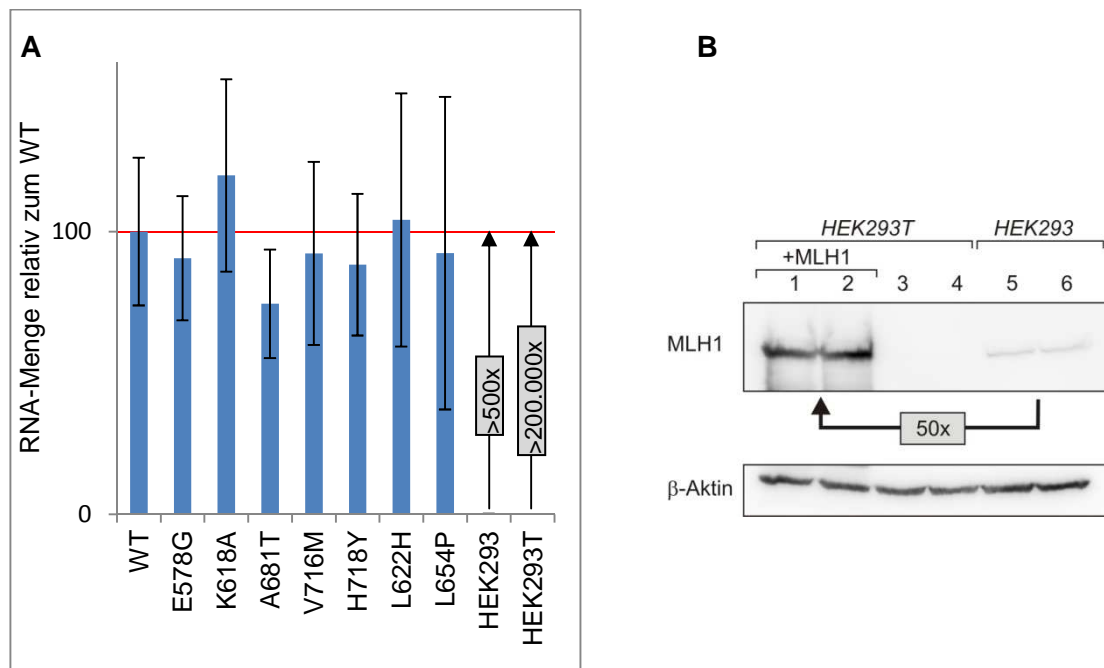


Abbildung 28: mRNA-Mengen der untersuchten Varianten. **A** Aus *HEK293T*-Zellen, die die MLH1-Varianten und PMS2 exprimieren, sowie aus *HEK293T*- und *HEK293*-Zellen wurde RNA isoliert. Nach einer reversen Transkription wurde die MLH1-Kopienzahl durch eine quantitative *real time*-PCR gemessen. Die mRNA-Mengen wurden relativ zum Wildtyp berechnet. **B** Aus *HEK293*-, *HEK293T*- und *HEK293T*-Zellen, die mit MLH1 transfiziert wurden, wurden Proteine isoliert. Die Detektion von MLH1 erfolgte auf dem Western Blot.

Untersucht wurden die fünf Varianten mit reduzierter MLH1-Expression, die beiden Kontrollen L622H und L654P, da diese Varianten ebenfalls hohe Reparaturaktivitäten und reduzierte Expression aufweisen, sowie *HEK293*- und *HEK293T*-Zellen.

Die Varianten zeigen MLH1-Kopienzahlen, die mit den Werten, die für den MLH1-Wildtyp ermittelt wurden, vergleichbar sind und korrelieren nicht mit den ermittelten Expressionswerten. Die endogene MLH1-mRNA-Menge ist über 500-mal geringer, als die in *HEK293T*-Zellen, in denen MLH1 überexprimiert wurde. Diese Differenz ist auf Proteinebene wesentlich kleiner. In den *HEK293T*-Zellen, in denen MLH1 überexprimiert wurde, wurde etwa 50-mal so viel MLH1-Protein exprimiert, wie endogenes MLH1 in *HEK293*-Zellen.

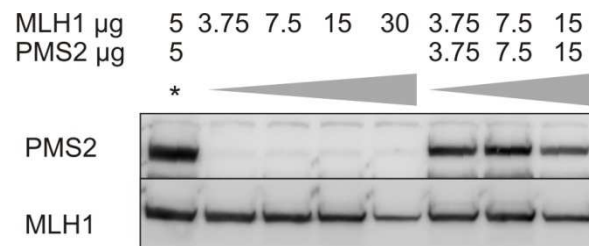


Abbildung 29: Abhängigkeit des Proteingehalts von der eingesetzten Plasmid-DNA-Menge. Unterschiedliche Mengen Plasmid-DNA wurden für die Transfektion von *HEK293T*-Zellen eingesetzt. Die Proteinmengen wurden anschließend auf einem Western Blot detektiert. \* markiert die Plasmidmenge, die in allen Experimenten verwendet wurde.

Die detektierte Proteinmenge reflektierte außerdem nicht die eingesetzte Plasmid-DNA-Menge (Abbildung 29). Bei großer Menge Plasmid-DNA sinkt die resultierende Proteinmenge. Bei Proteinmengen zwischen 3,75  $\mu\text{g}$  und 15  $\mu\text{g}$  ist der resultierende Proteingehalt immer gleich hoch.

### 3.3.2 BESTIMMUNG DER PROTEINSTABILITÄT

Nachdem die mRNA-Mengen der MLH1-Varianten bestimmten wurden und gezeigt wurde, dass die unterschiedlichen Proteinmengen nicht in unterschiedlichen mRNA-Mengen begründet sind, wurde die Proteinstabilität einzelner MLH1-Varianten mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Mit dem *Thermal-Shift*-Assay wurde die Stabilität des aufgereinigten MLH1-Proteins untersucht und mit dem *Pulse-Chase*-Assay wurde der Abbau des *in vitro* transkribierten und translatierten Proteins im Lysat analysiert.

Die Proteinstabilität sollte außerdem *in vivo* detektiert werden. Dazu wurden *HEK293T*-Zellen die transient MLH1 oder MLH1-Varianten exprimieren mit Cycloheximid behandelt. Cycloheximid (CHX) ist ein von *Streptomyces griseus* produziertes Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen inhibiert. Es wirkt an den 80S-Ribosomen und hemmt dort sowohl die Initiation als auch die Elongation der Proteinsynthese (Obrig et al. 1971). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben genommen und der Proteinabbau wurde anschließend mittels Western Blot detektiert. Die mit dieser Methode beobachteten Ergebnisse erwiesen sich jedoch als wenig reproduzierbar, deshalb wurden die Ergebnisse hier nicht dargestellt.

3.3.2.1 ERMITTLUNG DER STABILITÄT IM *THERMAL-SHIFT*-ASSAY

Die Stabilität der unterschiedlichen MLH1-Varianten wurde im *Thermal-Shift*-Assay untersucht. Für diesen Assay wurde aufgereinigtes MLH1 eingesetzt, das in *Sf9*-Zellen exprimiert wurde. Es folgte die Isolierung von nativem Protein und schließlich die Aufreinigung über den His-Tag. Hierdurch konnte eine starke Aufreinigung der Proteine erreicht werden (Abbildung 30).

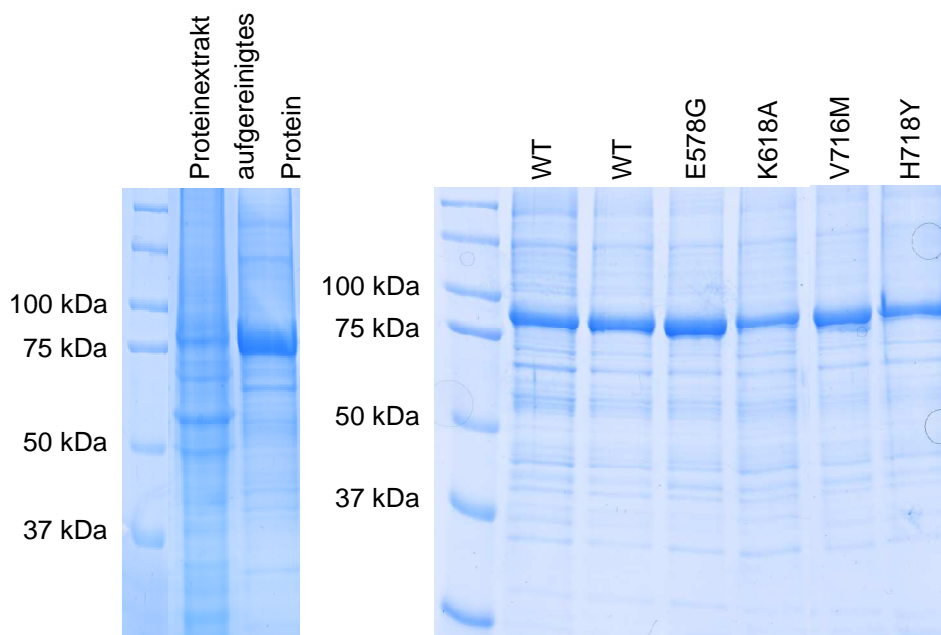


Abbildung 30: Aufgereinigtes MLH1-Protein, das für den *Thermal-Shift*-Assay eingesetzt wurde. Auf das Gel in der linken Abbildung wurde die Probe zum Vergleich vor und nach der Aufreinigung aufgetragen. Die rechte Abbildung zeigt Proteinaufreinigungen der verschiedenen Varianten und des Wildtyps (WT).

Die MLH1-Variante A681T konnte aufgrund schwacher Expression mit diesem Protokoll nicht in *Sf9*-Zellen exprimiert und aufgereinigt werden.

Für die Untersuchung der Stabilität wurde das aufgereinigte Protein in Gegenwart von Sypro Orange von 25 °C auf 75 °C erwärmt. Sypro Orange bindet an hydrophobe Aminosäuren, die bei der Entfaltung aufgrund steigender Temperaturen vermehrt exponiert werden. Die resultierende Fluoreszenz wurde gemessen.

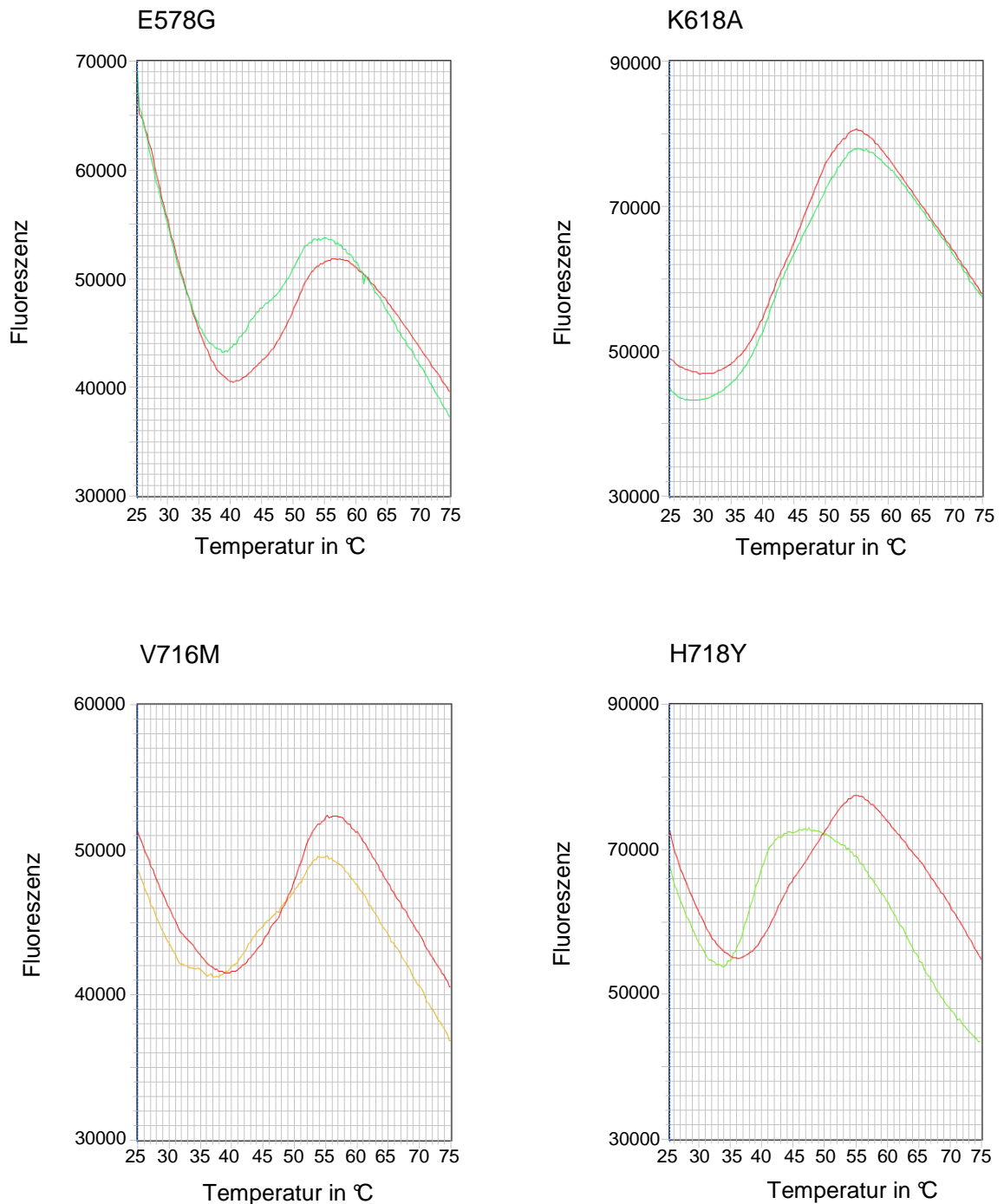


Abbildung 31: *Thermal-Shift-Assay*. Aufgereinigtes MLH1 wurde in Gegenwart von Sypro Orange erwärmt. Sypro Orange bindet an hydrophobe Aminosäuren, die aufgrund der Entfaltung durch die höheren Temperaturen vermehrt präsentiert werden. Die Fluoreszenz, die Sypro Orange als Folge der Bindung an MLH1 aussendet, wirkt als Reporter der Entfaltung. Die roten Kurven stellen die Fluoreszenz des Wildtyps dar, die gelben bzw. grünen die der jeweiligen Variante.

Die Diagramme in Abbildung 31 zeigen die gemessene Fluoreszenz während der Erwärmung der Ansätze von 25 °C auf 75 °C. In rot ist jeweils das Signal des Wildtyps dargestellt, die Kurve des Signals der jeweiligen Variante ist grün oder gelb gefärbt. Die

Varianten wurden jeweils gemeinsam mit dem Wildtyp gemessen. Für E578G, V716M und H718Y ist die Verschiebung der Kurve der Variante im Verhältnis zu der des Wildtyps deutlich zu sehen. Bei der Variante K618A fällt diese Verschiebung geringer aus.

Um den Vergleich der Ergebnisse aller Assays zu ermöglichen, wurde aus den Fluoreszenzwerten unter Annahme eines Boltzmann-sigmoidalen Kurvenverlaufs der x-Wert des Wendepunktes (V50) berechnet. V50 ist also die Temperatur der mittleren Entfaltung. Wenn V50 als Maß für die mittlere Entfaltung des Proteins genutzt wird, kann die Differenz der V50-Werte als Differenz der mittleren Entfaltung bezeichnet werden. Die Differenz der V50-Werte wurde nicht aus den Mittelwerten berechnet, sondern aus den Einzelmessungen.

In Tabelle 3 sind die berechneten Mittelwerte für die V50 Werte (MWV50) sowie die zugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ) angegeben. Die Differenz der V50-Werte ist in der Tabelle als  $V50_{\text{Variante}} - V50_{\text{WT}}$  angegeben, ebenfalls mit der zugehörigen Standardabweichung. In die Mittelwerte gingen die Ergebnisse von mindestens 10 Experimenten ein. Der MLH1-Wildtyp weist mit 47 °C den höchsten V50-Mittelwert auf, für K618A wurde nur ein etwas geringerer Mittelwert berechnet (45,8 °C), E578G und V716M liegen mit 43,2 °C bzw. 41,6 °C in der Mitte und H7 18Y hat mit nur noch ca. 39 °C den geringsten V50-Wert (Abbildung 32).

Tabelle 3: Ergebnisse der *Thermal-Shift*-Assays. Darstellung der V50-Mittelwerte, des Wertes für die mittlere Entfaltung des Proteins, sowie die Differenz der V50-Werte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen.

	WT	E578G	K618A	V716M	H718Y
<b>MW V50</b> in °C	47,072	43,188	45,803	41,578	39,248
$\sigma$	2,465	2,605	2,387	1,833	3,057
<b>V50<sub>Variante</sub> - V50<sub>WT</sub></b> in °C		-4,277	-0,677	-5,980	-7,803
$\sigma$		1,062	0,500	2,152	0,874

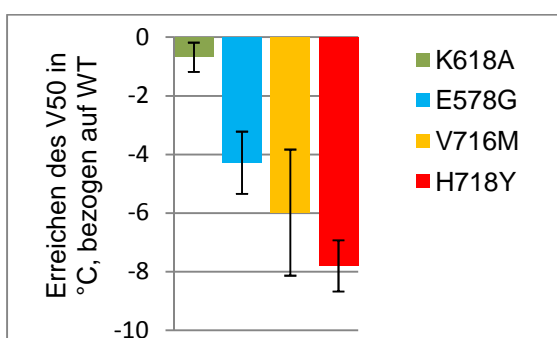


Abbildung 32: Im *Thermal-Shift*-Assay ermittelte Stabilitätsunterschiede. Das Diagramm zeigt die Differenzen der V50-Werte zwischen den Varianten und dem Wildtyp (WT). Die V50-Werte geben den Zeitpunkt der mittleren Entfaltung an.

### 3.3.2.2 BESTIMMUNG DER PROTEINSTABILITÄT *IN VITRO* DURCH DEN *PULSE-CHASE*-ASSAY

Im *Pulse-Chase*-Assay erfolgten Transkription und Translation von MLH1 und PMS2 *in vitro*, in Gegenwart von radioaktivmarkiertem Methionin (*pulse*). Anschließend wurde die Proteinsynthese unterbrochen und der Abbau des untersuchten Proteins beobachtet (*chase*), indem zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen wurden, die dann auf einem SDS-Gel mit anschließender Autoradiographie ausgewertet wurden.

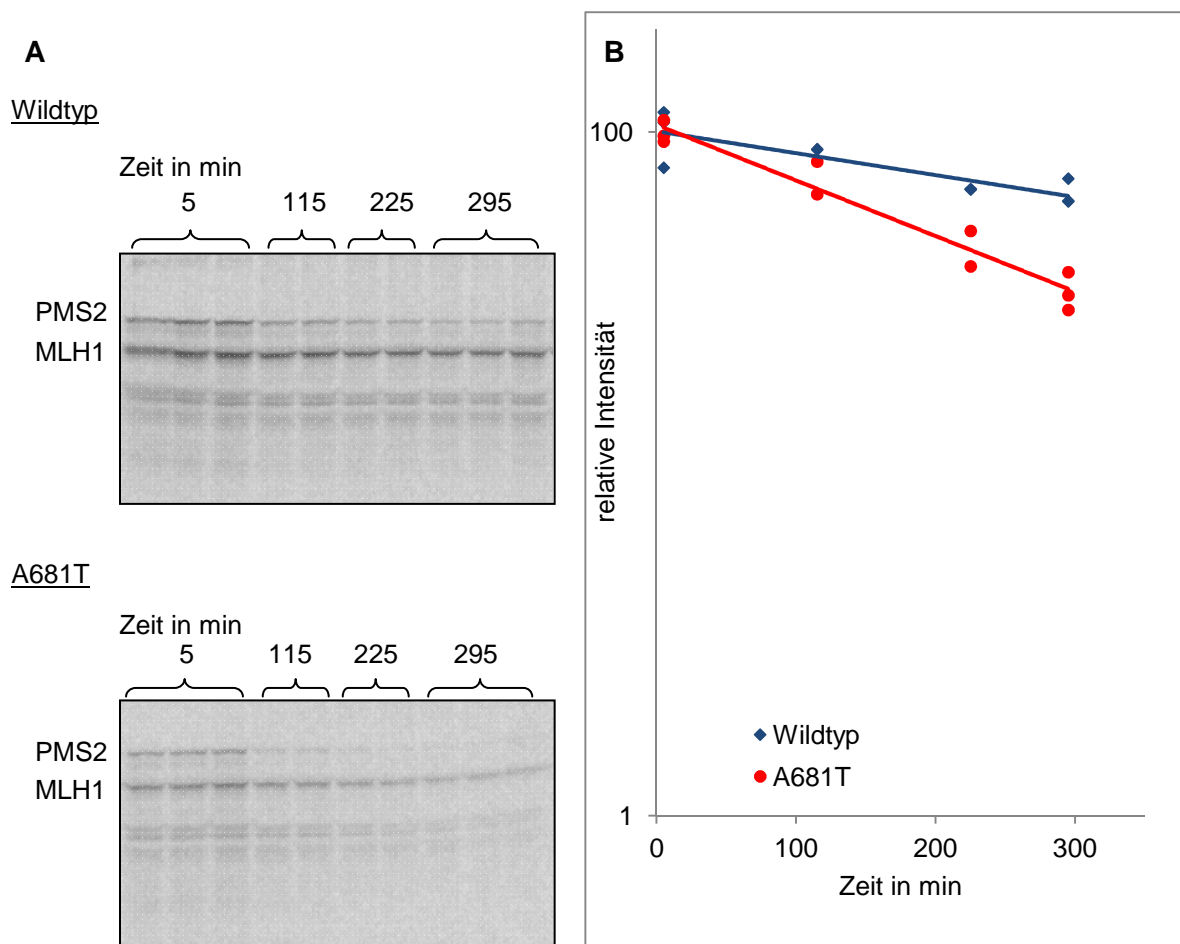


Abbildung 33: Proteinabbau im *Pulse-Chase*-Assay. Nach der *in vitro* Transkription und Translation von MLH1 und PMS2 in Gegenwart von  $^{35}\text{S}$ -Methionin wurde die Proteinbiosynthese unterbrochen und der Abbau der Proteine verfolgt, indem zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen wurden. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels SDS-Gel und Autoradiographie (A). In B wurden die Intensitäten im semilogarithmischen Diagramm dargestellt. Die Signale wurden als relative Intensitäten angegeben, d.h. die Intensität zum Zeitpunkt 0 wurde auf 100 gesetzt und die Signale zu den späteren Zeitpunkten wurden darauf bezogen. Die Y-Achse wurde logarithmisch dargestellt, so dass der exponentiell verlaufende Abbau linear erscheint.

Die Autoradiogramme für den Abbau zweier Proteine sind in Abbildung 33 dargestellt. Während beim Wildtyp nur eine leichte Abnahme des MLH1-Signals detektiert wurde, war die Menge an MLH1 A681T nicht nur zu Beginn deutlich niedriger, auch die Reduktion des Signals der Proben zu späteren Zeitpunkten war deutlicher. Der Assay wurde für den Wildtyp und alle Varianten mehrmals wiederholt. Die Ergebnisse aller Experimente sind in Abbildung 34 dargestellt und die resultierenden Regressionsgraden zeigen die unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten an.

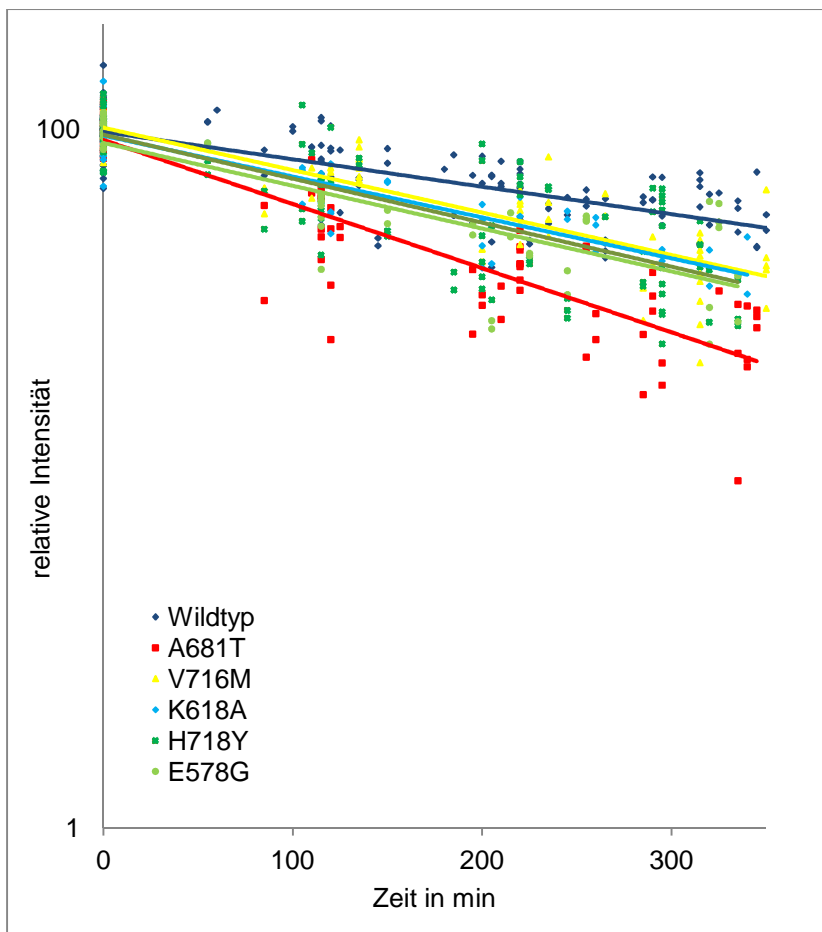


Abbildung 34: Semilogarithmisches Diagramm des Proteinabbaus von Wildtyp und Varianten. Im Diagramm wurden alle ermittelten Werte als relative Intensitäten aufgetragen und die zugehörige Regressionsgerade bestimmt.

Die Regressionsgeraden, die aus allen für eine Variante gemessenen Werten resultieren, zeigen, dass das Wildtyp-MLH1 schneller abgebaut wurde als die untersuchten MLH1-Varianten. Die Variante A681T wurde am langsamsten abgebaut. Aus den Funktionen der Regressionsgeraden wurden die Halbwertszeiten berechnet (Tabelle 4).

Für den Wildtyp wurde eine Halbwertszeit von über 6 h bestimmt, die Varianten E578G, K618A, V716M und H718Y wiesen Halbwertszeiten von ca. 4 h auf und für A681T wurde eine Halbwertszeit von nur 2,7 h bestimmt. Die Halbwertszeiten sind auch in Abbildung 35



als Säulendiagramm dargestellt. In diesem Assay wurde für MLH1-Wildtyp die höchste Stabilität bestimmt und für A681T die niedrigste. Die anderen vier Varianten unterschieden sich kaum.

Tabelle 4: Halbwertszeiten der getesteten MLH1-Varianten bestimmt mit dem *Pulse-Chase*-Assay. Die Halbwertszeiten (HWZ) sind in Minuten und Stunden angegeben. Der Abbau wurde als relativer Abbau, bezogen auf den Wildtyp, angegeben. Außerdem sind die Abbaukonstante  $k$  und das Bestimmtheitsmaß, als Maß für die Variabilität der Werte, aufgeführt.

Variante	HWZ (min)	HWZ (h)	Abbau in %	$k$	Bestim.Maß
WT	383	6,38	100	0,00181	0,5849
K618A	257	4,28	67	0,0027	0,789
V716M	248	4,13	65	0,00280	0,7636
E578G	246	4,10	64	0,00282	0,6558
H718Y	239	3,98	62	0,00290	0,6357
A681T	164	2,73	43	0,00423	0,8053

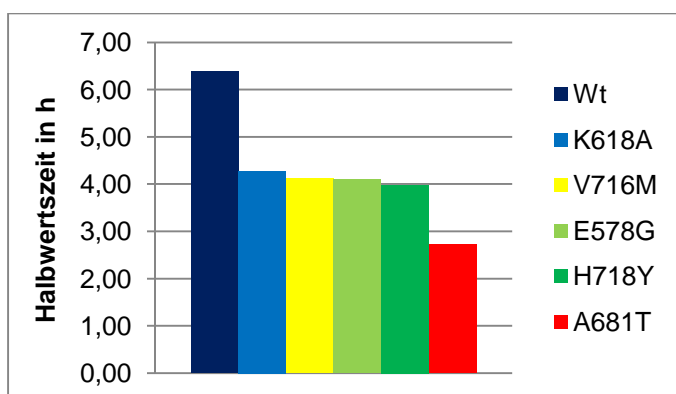


Abbildung 35: Halbwertszeiten der MLH1-Variante, bestimmt durch den *Pulse-Chase*-Assay. Für den Wildtyp wurde mit über 6 h die höchste Halbwertszeit bestimmt, für A681T mit unter 3 h die niedrigste. Die anderen Varianten wiesen Halbwertszeiten von ca. 4h auf.

### 3.3.3 *IN SILICO*-ANALYSE

Zusätzlich zur experimentellen Analyse der Stabilität der untersuchten Varianten wurde eine *in silico*-Analyse mit unterschiedlichen Algorithmen durchgeführt. Es sollte getestet werden, in wie weit die verwendeten Programme die Ergebnisse der Experimente widerspiegeln. Die Ergebnisse der *in silico*-Analysen wurden in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammenstellung der Ergebnisse der *in silico* Analyse für ausgewählte Varianten. Für die Vorhersage des Einflusses von Aminosäureaustauschen auf die Proteinfunktion sind unterschiedliche Programme verfügbar. Für ausgewählte Varianten wurden die Programme IAPP-MMR, CUPSAT, PANTHER, PolyPhen und SIFT verwendet. IAPP-MMR: Werte <3 neutral, 3-5 grenzwertig; CUPSAT: -destabilisierend, + stabilisierend; PANTHER: P<sub>deleterious</sub>=Wahrscheinlichkeit, dass Variante negativen Einfluss hat (Werte von 0-1); PolyPhen: gutartig, vielleicht schädigend, wahrscheinlich schädigend; SIFT: Wert <0,05 = schädigend.

Variante	Expression	Reparatur	IAPP - MMR		CUPSAT		PANTHER		PolyPhen		SIFT
	Wert	Wert	Wert	thermisch	chemisch	subPSEC	P <sub>deleterious</sub>	Vorhersage	Differenz WT/Variante	Wert	
K618A	78	92	5,06	-0,6	0	-2,941	0,4852	vielleicht schädigend	1,989	0,0	
E578G	71	91	4,85	-2,6	0,7	-3,792	0,6882	vielleicht schädigend	1,933	0,05	
V716M	64	88	2,78	-0,4	2,06	-2,7988	0,4499	gutartig	0,22	0,21	
H718Y	73	110	3,45	-0,7	-0,4	-3,6782	0,6633	wahrscheinlich schädigend	2,596	0,01	
A681T	52	99	4,41	0,4	0,7	-3,8746	0,7657	vielleicht schädigend	1,628	0,0	
L622H	42	80	12,9	-6,5	3,1	-6,4878	0,9703	wahrscheinlich schädigend	2,39	0,0	
T117M	44	5	21,05	1,41	-1,39	-6,0066	0,9529	wahrscheinlich schädigend	2,427	0,0	
P654L	25	67	19,2	0,4	2,4	-3,4499	0,6106	wahrscheinlich schädigend	3,245	0,0	
L749P	85	15	37,37	-2,6	2,2	-6,0248	0,9537	wahrscheinlich schädigend	2,719	0,0	
R659P	13	8	11,7	-3,6	0,1	-3,9257	0,7162	wahrscheinlich schädigend	2,455	0,01	

Mit CUPSAT wurden die Varianten mit den Einstellungen für thermische und für chemische Denaturierung überprüft. In der Einstellung für thermische Denaturierung wurde für die Varianten L622H, L749P, R659P und E578G ein destabilisierender Einfluss vorhergesagt. Die Ergebnisse konnten nicht mit den Ergebnissen aus dem *Thermal-Shift*-Assay, der sich ebenfalls auf die thermische Stabilität bezieht, korreliert werden. Die Ergebnisse mit den Einstellungen für die chemische Denaturierung unterscheiden sich stark von denen für thermische Denaturierung. Für Variante T117M wurde ein negativer Einfluss auf die Stabilität vorhergesagt, alle anderen Varianten wurden als neutral oder stabilisierend bewertet.

PANTHER gibt mit *Pdeleterious* die Wahrscheinlichkeit an, dass der untersuchte Aminosäureaustausch die Proteinfunktion beeinflusst. Die als pathogen eingestuften Varianten L622H, T117M und L749P wiesen Wahrscheinlichkeiten von über 95 % auf, für R659P wurde eine Wahrscheinlichkeit von 72 % ermittelt, für P654L 61 %. Insgesamt wurden für die Varianten mit verringerter Expression etwas geringere Werte bestimmt. Die Werte lagen zwischen 76 % für die Veränderung A681T und 45 % für V716M.

Von PolyPhen wurden alle pathogenen Varianten als „vermutlich schädigend“ eingestuft, ebenso die Variante H718Y, wobei „vermutlich schädigend“ die schlechteste Einschätzung ist. Die Varianten K618A, E578G und A681T wurden als „vielleicht schädigend“ beschrieben und V716M als gutartig.

SIFT ordnet alle Variante die einen SIFT-Wert von kleiner 0,05 erhalten als schädlich ein, somit wurde lediglich für die Veränderungen E578G und V716M kein schädlicher Einfluss vorhergesagt.

Das Programm MAPP-MMR ermittelte für alle pathogenen Varianten einen MAPP-MMR-Wert von deutlich über 10 und für die Varianten mit reduzierter Expression Werte zwischen 2,78 und 5,06. Varianten mit einem Wert unter 3 werden als neutral eingestuft, dies traf auf V716M mit einem Wert von 2,78 zu. Varianten mit Werten zwischen 3 und 5 werden als grenzwertig (*borderline*) bezeichnet, das traf auf die anderen vier Varianten mit eingeschränkter MLH1-Expression zu. Auch wenn K618A mit einem Wert von 5,06 knapp über einem Wert von 5 liegt, so ist der Wert doch deutlich geringer, als die der pathogenen Varianten, für die Werte zwischen 11,7 und 37,4 ermittelt wurden.

Die pathogenen Veränderungen wurden von MAPP-MMR, PolyPhen und SIFT als schädigend vorhergesagt und auch PANTHER bestimmte für drei Varianten sehr hohe und für die anderen beiden Varianten Wahrscheinlichkeiten deutlich über 50 %. Jedoch wurden zum Beispiel von PANTHER fast alle getesteten Varianten als pathogen vorhergesagt und die geringen Unterschiede in der Expression der fünf weiteren Varianten wurden durch die errechneten Werte nicht widerspiegelt.

Die höchste Übereinstimmung zwischen Vorhersage und den Ergebnissen zeigte MAPP-MMR. Deshalb wurde MAPP-MMR auf alle im Screening betrachteten Varianten angewendet. In Tabelle 6 sind die MAPP-MMR-Werte für alle untersuchten Varianten aufgeführt. In Abbildung 36 wurden die ermittelten Werte farblich in dem Diagramm mit den Ergebnissen des Screenings dargestellt.

Tabelle 6: MAPP-MMR-Werte für alle im Screening getesteten Varianten. Für Y750X konnte kein Wert berechnet werden, da MAPP-MMR nicht auf Deletionen angewendet werden kann.

Variante	MAPP-MMR Wert	Variante	MAPP-MMR Wert	Variante	MAPP-MMR Wert	Variante	MAPP-MMR Wert
<b>I8A</b>	23,99	<b>S106R</b>	35,57	<b>L559R</b>	14,96	<b>T662P</b>	3,33
<b>I8E</b>	29,99	<b>H109Q</b>	2,55	<b>Q562A</b>	8,83	<b>E663G</b>	4,27
<b>L11A</b>	20,7	<b>T117M</b>	21,05	<b>L574P</b>	15,98	<b>V664R</b>	32,82
<b>L11E</b>	29,97	<b>D132H</b>	4,73	<b>E578G</b>	4,85	<b>L676R</b>	34,47
<b>R18C</b>	23,4	<b>V213M</b>	1,99	<b>A586P</b>	9,17	<b>A681T</b>	4,41
<b>I19F</b>	9,59	<b>I219V</b>	3,51	<b>D601G</b>	3,03	<b>V716M</b>	2,78
<b>E23D</b>	13,31	<b>R265H</b>	13,62	<b>K618A</b>	5,06	<b>H718Y</b>	3,45
<b>N38H</b>	14,29	<b>D304V</b>	20,7	<b>L622H</b>	12,9	<b>R725C</b>	6,39
<b>D41G</b>	20,85	<b>N338S</b>	2,78	<b>P640S</b>	17,5	<b>L749P</b>	37,37
<b>G54E</b>	39,18	<b>R385C</b>	3,68	<b>P648L</b>	6,87	<b>Y750X</b>	-
<b>G65D</b>	35,86	<b>R385P</b>	5,22	<b>L653R</b>	34,11	<b>K751R</b>	2,3
<b>T82I</b>	30,77	<b>V506A</b>	5,56	<b>P654L</b>	19,2	<b>R755S</b>	21,57
<b>K84E</b>	23,17	<b>R522W</b>	4,3	<b>R659L</b>	4,59	<b>R755W</b>	22,31
<b>G101D</b>	36,07	<b>Q542L</b>	24,21	<b>R659P</b>	11,7		
<b>E102K</b>	19,54	<b>N551T</b>	7,79	<b>R659Q</b>	3		

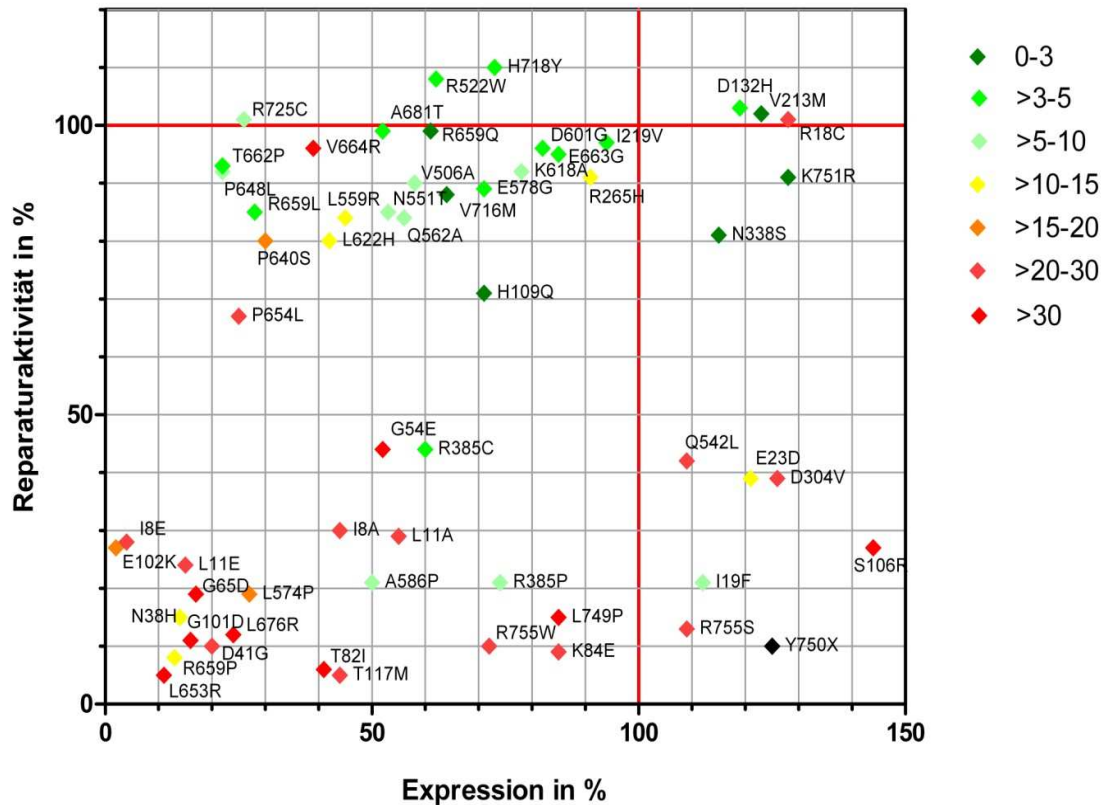


Abbildung 36: Übereinstimmung der MAPP-MMR-Werte mit den Ergebnissen des Screenings. Die MAPP-MMR-Werte für alle Varianten wurden farblich dargestellt: rot weist auf einen hohen MAPP-MMR Wert hin, grün zeigt einen niedrigen MAPP-MMR-Wert an.

Am Diagramm in Abbildung 36 lässt sich zeigen, dass MAPP-MMR die Reparaturfähigkeit in der Regel gut vorhersagt. Für fast alle Varianten, für die geringe Reparaturaktivitäten bestimmt wurden, wurden MAPP-MMR-Werte über 10 (in gelb, orange oder rot) bestimmt und nur für eine einzige Variante in diesem Bereich wurde ein Wert unter fünf ermittelt (R385C). Einen Einfluss von reduzierter Expression auf die Pathogenität von Varianten kann MAPP-MMR hingegen nicht vorhersagen. Auch Varianten, die Expressionswerte von unter 50 % aufwiesen, wurden zum Teil als grenzwertig (MAPP-MMR-Wert zwischen 3 und 5) eingestuft.

### 3.4 BESTÄTIGUNG DER REPARATURDEFIZIENZ VON *HEK293T*-ZELLEN *IN VIVO*

Zunächst sollte bestätigt werden, dass *HEK293T*-Zellen defizient in der MMR sind. Hierzu wurden zwei Mikrosatelliten-Loci mittels Fragmentanalyse untersucht.

Die untersuchten Loci BAT25 und BAT26 gehören zu den fünf üblicherweise getesteten Mikrosatelliten (Boland et al. 1998). BAT25 ist eine Wiederholung von 25 Thyminen im Intron 16 des *c-kit* Onkogens und BAT26 besteht aus 26 Adeninen im Intron 5 von *MSH2*. *HEK293*- und *HEK293T*-Zellen wurden so weit vereinzelt, dass die Nachkommen einer Zelle analysiert werden konnten. Aus diesen Zellen wurde DNA extrahiert und mittels PCR wurde ein Fragment amplifiziert, das den Bereich der Basen-Wiederholung umfasst. Die Länge dieses Fragments wurde gegen einen Standard gemessen. In Tabelle 7 sind die gemessenen Fragmentlängen aufgeführt.

Tabelle 7: Ermittelte Fragmentlängen für *HEK293*- und *HEK293T*-Zellen für BAT25 und BAT26. Bei Proben, bei denen mehrere Werte angegeben sind, wurden verschiedene Fragmentlängen gemessen. Die *HEK293T*-Zellen zeigen nicht nur viele Proben mit verschiedenen Fragmenten, es wurde auch eine Vielzahl von Kombinationen gemessen.

	<i>HEK293</i>	<i>HEK293T</i>
<b>BAT25</b>	17 x 121 bp	16 x 116 bp
	6 x 120 bp	14 x 117/120 bp
	1 x 115/121 bp	9 x 117 bp
		9 x 117/121 bp
		3 x 118 bp
		2 x 116/120 bp
		1 x 108/111 bp
		1 x 111/116
		1 x 116/121 bp
		1 x 110/116
<b>BAT26</b>	42 x 116 bp	14 x 108/112 bp
		7 x 108/111 bp
		4 x 109/112 bp
		2 x 104/108/111 bp
		2 x 105/108/112 bp
		1 x 105/108/111 bp
		1 x 104/108/112 bp
		1 x 109/113 bp

Die *HEK293T*-Zellen wiesen eindeutig eine Mikrosatelliteninstabilität auf. Nicht nur, dass in den meisten Proben zwei oder drei unterschiedliche Fragmente gemessen wurden, es wurde auch eine Vielzahl von unterschiedlichen Kombinationen gemessen. Die Vielfalt an

Kombinationen zeigt, wie schnell sich die Zellen verändern. Die DNA wurde, 28 Tage nachdem die Zellen zum ersten Mal vereinzelt wurden, extrahiert.

Die Zelle, von der die jeweiligen Zellpopulationen abstammten, wies eine der Fragmentlängen-Kombinationen auf, aus der die verschiedenen Kombinationen entstanden. Bei den *HEK293*-Zellen wurden nur in einer einzigen Probe, für BAT25, zwei verschiedene Längen bestimmt.

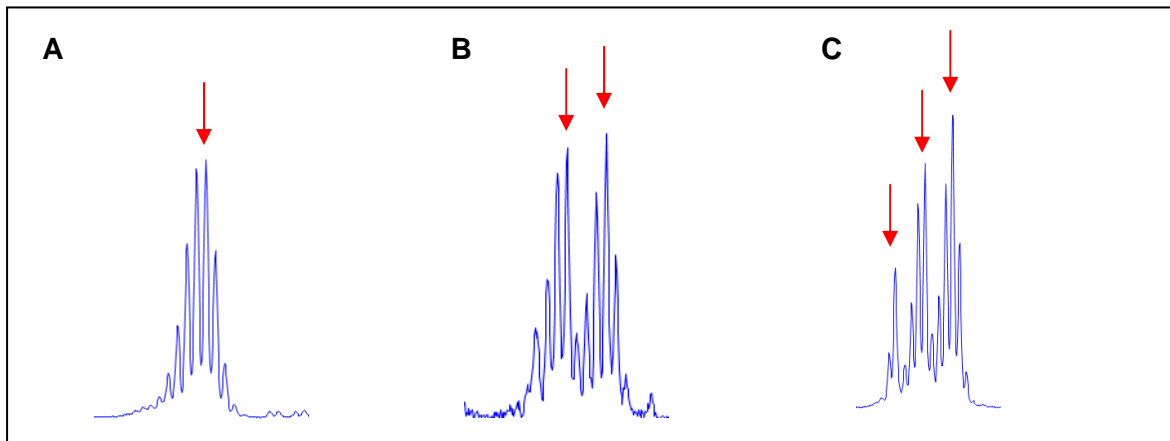


Abbildung 37: Signale in der Fragmentanalyse. Das Maximum des Signals zeigt die Fragmentlängen an. In A wurde ein Fragment detektiert, in B zwei unterschiedliche und in C sogar drei verschiedene. Gleichzeitig wird ein ebenfalls mit einem Farbstoff markierter Standard gemessen, so dass die Länge bestimmt werden kann.

### 3.5 BESTIMMUNG DER ERFORDERLICHEN MLH1-MENGE FÜR EINE AUSREICHENDE REPARATUR

Um die MLH1-Menge zu bestimmen, die notwendig ist, um eine ausreichende Reparatur zu gewährleisten, wurde *HEK293*-Kernextrakt mit *HEK293T*-Kernextrakt verdünnt. *HEK293*-Zellen sind MHL1-profizient, während *HEK293T*-Zellen kein MLH1 exprimieren. Durch die Vermengung der unterschiedlichen Kernextrakte wurde eine schrittweise Reduktion des endogenen MLH1-Gehalts erreicht. Proben mit einem MLH1-Gehalt von 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, und 100 % wurden im MMR-Assay untersucht (Abbildung 38).

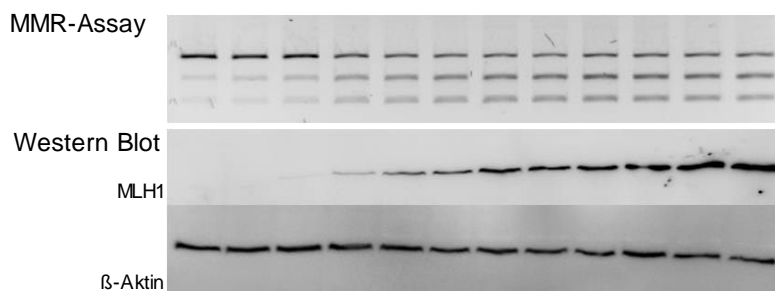
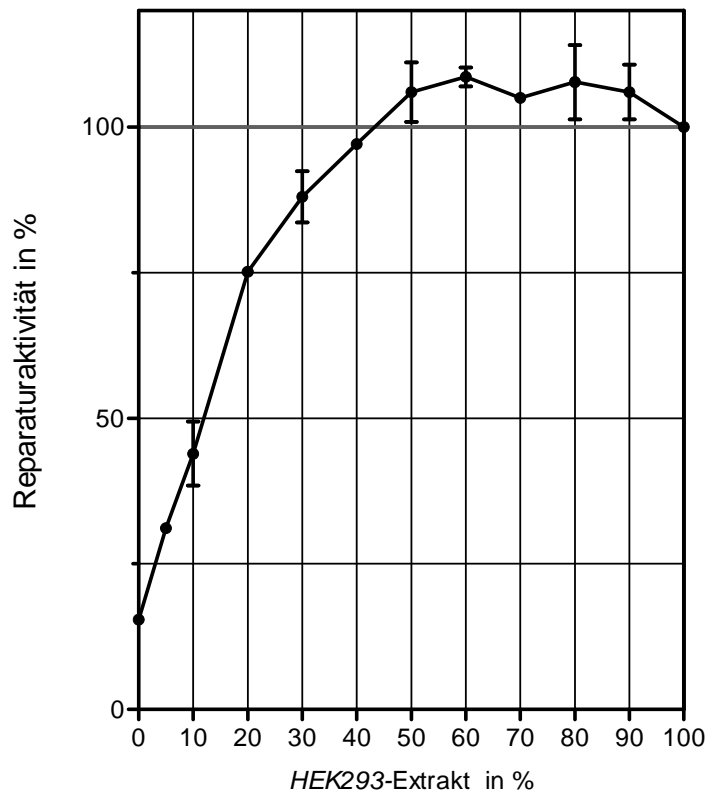


Abbildung 38: Untersuchung des erforderlichen MLH1-Gehalts für eine erfolgreiche Reparatur. *HEK293*-Kernextrakt (MLH1-profizient) wurde mit *HEK293T*-Kernextrakt (MLH1-defizient) in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, so dass eine schrittweise Verdünnung von MLH1 erreicht wurde. Diese Proben wurden für den MMR-Assay eingesetzt. Im Western Blot wurde der MLH1-Gehalt überprüft, die Detektion von  $\beta$ -Aktin diente der Kontrolle der Beladung des Western Blots. Die berechneten Reparaturaktivitäten sind im Diagramm dargestellt.

Die Reparaturaktivität nimmt zu bis zu einem Anteil an *HEK293*-Zellextrakt von 40 %, d.h. bis zu einem MLH1-Anteil von 40 %. Die Proben mit einem höheren MLH1-Gehalt zeigen eine gleichbleibend hohe Reparaturaktivität, die jedoch nicht weiter zunimmt. Demzufolge reichen 40 – 50 % MLH1 aus, um die maximale Reparatur zu ermöglichen. Bei einem höheren MLH1 Gehalt verbessert sich die Reparatur nicht mehr.



## 4 DISKUSSION

Auch wenn Familien aufgrund einer überdurchschnittlichen Häufung von Familienmitgliedern mit Kolon- oder Endometriumkarzinomen in jungem Alter einen auf das Lynch-Syndrom weisenden klinischen Phänotyp zeigen (Jass 1998; Lynch et al. 1998), kann die Diagnose des Lynch-Syndroms nur erfolgen, wenn beim Patienten eine inaktivierende Mutation in einem der vier *Mismatch*-Reparaturgene nachgewiesen werden kann. Die meisten der Mutationen treten in MLH1 auf (Peltomaki and Vasen 2004) und etwa ein Drittel der detektierten Veränderungen sind Punktmutationen, die in Missense-Varianten resultieren. Da diese Veränderungen in ihrer Pathogenität häufig nicht beurteilt werden können, werden sie als VUS eingestuft und die Angehörigen der Träger dieser Varianten erhalten keinen Zugang zu einem prädiktiven genetischen Test und zu Vorsorgeprogrammen.

### 4.1 IM SCREENING WURDEN VIER GRUPPEN VON MLH1-VARIANTEN DETEKTIERT

Für das Screening wurden Expression und Reparaturaktivität analysiert. Bei diesen Parametern ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass viele Varianten betroffen sind. Da im Screening Missense-Varianten und eine Deletionsvariante untersucht wurden, also Varianten mit Punktmutationen im kodierenden Bereich, wurde ein Einfluss auf Transkriptebene als unwahrscheinlich eingeschätzt (Tournier et al. 2008; Santibanez Koref et al. 2010). Eine weitere Möglichkeit eines Defektes, der zur Inaktivierung von MLH1 führt, wäre eine fehlende Lokalisation in den Zellkern. Jedoch ist zu erwarten, dass von einem solchen Defekt nur Varianten betroffen sind, die eine Veränderung in der Kernlokalisationssequenz aufweisen, außerdem ist die Sequenz bekannt (Brieger et al. 2005).

Die Analyse der Expression wurde gewählt, weil in vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde, dass die Expression vieler Missense-Varianten eingeschränkt ist (u.a. (Raevaara et al. 2005; Takahashi et al. 2007; Hardt et al. 2011)). Die Analyse der Reparaturaktivität mittels des MMR-Assays wurde verwendet, weil hiermit eine katalytische Gesamt-Aktivität von MutL $\alpha$  getestet werden kann, die vielfältige Einzelprozesse umfasst: die Dimerisierung von MLH1 und PMS2, die Interaktion mit anderen Proteinen wie MutS $\alpha$  und EXOI, sowie die ATP-Hydrolyse. Das verwendete DNA-Substrat enthält den

Einzelstrangbruch 3' vom G-T-*Mismatch*. Während die 5' Reparatur ohne MutLα ablaufen kann, ist eine Reparatur eines Substrates mit dem Einzelstrangbruch auf der 3'-Seite nur möglich, wenn MutLα mit seiner Endonukleasefunktion einen weiteren Einzelstrangbruch auf der 5'-Seite einführt. So wird mit dem MMR-Assay auch die Aktivität der Endonuklease überprüft.

Das Screening zeigte, dass viele der untersuchten Varianten vom Wildtyp abweichende Reparaturaktivitäten und Expression aufweisen. Eingeschränkte Proteinexpression ist ein Kernproblem von MLH1-Varianten: für 40 % der untersuchten Varianten wurden MLH1-Mengen unter 50 % im Vergleich zum Wildtyp detektiert. Die Hälfte der Varianten wies eine Reparaturaktivität unter 50 % auf.

Die Ergebnisse des Screenings können jedoch nicht unmittelbar für die Bestimmung der Pathogenität verwendet werden. Für die getesteten Parameter, also MLH1-Expression und Reparaturfähigkeiten, muss zunächst bestimmt werden, in wieweit ein in einem Assay bestimmter funktioneller Defekt sich in der Pathogenität einer Variante widerspiegelt.

Die fehlende Validierung ist ein häufiges Problem in der Beurteilung von Varianten. Viele der Varianten wurden zuvor bereits von anderen Gruppen mit unterschiedlichen Methoden untersucht (Raevaara et al. 2005; Takahashi et al. 2007; Hardt et al. 2011; Kondo et al. 2003; Perera and Bapat 2008), jedoch konnte die Pathogenität häufig nicht geklärt werden, oder die abschließende Bewertung beruhte auf einer subjektiven Einschätzung, da keine Validierung vorlag.

So wurde die Expression von Raevaara et al. lediglich in „normal“ und „vermindert“ (Raevaara et al. 2005) und von Takahashi et al. und Hardt et al. in < 25 %, 25-75 % und >75% unterteilt (Takahashi et al. 2007; Hardt et al. 2011). Diese Unterteilungen waren zum einen abhängig von der Möglichkeit der sensitiven Vermessung und zum anderen waren die Grenzen letztendlich willkürlich festgesetzt.

Aus dem Screening wurden Varianten mit Veränderungen im C-Terminus für die Untersuchung der Dimerisierung von MLH1 und PMS2 gewählt. Außerdem wurden Varianten ausgesucht, um die nötige MLH1-Menge zu validieren, die eine ausreichende Reparatur gewährleistet und damit zur Apathogenität führt.

## 4.2 DIE DIMERISIERUNGSFLÄCHE WIRD VON DEN AUßENLIEGENDEN SUBDOMÄNEN GEBILDET

Die Bildung des MutL $\alpha$ -Dimers ist für die *Mismatch*-Reparatur notwendig. Die grundlegende Dimerisierung erfolgt über den C-Terminus von MLH1 und PMS2 (Guerrette et al. 1999; Nystrom-Lahti et al. 2002; Plotz et al. 2003), die genaue Interaktionsfläche wurde jedoch kontrovers beschrieben. Ein Modell schlug vor, dass die Dimerisierungsfläche durch die „innenliegenden“ Subdomänen (*internal subdomains*) (Cutalo et al. 2006; Guarne et al. 2004; Kosinski et al. 2008) gebildet werden, ein anderes, dass die Interaktionsfläche aus dem „außenliegenden“ Subdomänen (*external subdomains*) besteht (Kosinski et al. 2008).

19 MLH1-Varianten, die eine Veränderung im C-Terminus aufwiesen, wurden auf einen Defekt in der MLH1-PMS2-Dimerisierung untersucht. Die Lage der Veränderungen in der Proteinstruktur und die Auswirkung auf die Dimerisierung ist in Abbildung 39 dargestellt. Die Veränderungen von sechs untersuchten Varianten lagen in der von Dr. Jan Kosiński vorhergesagten Interaktionsfläche (Kosinski et al. 2008), oder in direkter Nachbarschaft. Drei dieser Varianten stabilisierten PMS2 nicht. Für die drei Varianten Q542L, L749P und Y750X wurden sehr geringe PMS2-Mengen detektiert, obwohl stets die gleiche Plasmidmenge in die Zellen transfiziert wurde. Die fehlende Bildung funktionsfähigen MLH1-PMS2-Heterodimers spiegelte sich in den niedrigen Reparaturaktivitäten wider. Für keine der Varianten, deren Veränderungen in der anderen vorgeschlagenen Dimerisierungsfläche (Cutalo et al. 2006; Guarne et al. 2004) oder der direkten Umgebung lokalisiert sind, konnte eine fehlende PMS2-Stabilisierung nachgewiesen werden. Zwar zeigten die Varianten, deren Veränderungen in der potentiellen Interaktionsfläche liegen (P648L, T662P und P654L), eine so geringe MLH1-Expression, dass Rückschlüsse auf die PMS2-Stabilisierung kaum möglich sind, jedoch wiesen die drei Varianten hohe Reparaturaktivitäten auf. Da die Bildung des Heterodimers für die *Mismatch*-Reparatur essentiell ist, kann davon ausgegangen werden, dass Varianten, die reparieren keinen Defekt in der Dimerisierung aufweisen.

Für die Variante R659P wurde zuvor in verschiedenen Arbeiten, mit Methoden wie Hefe-Zwei-Hybrid-System (*Yeast Two-Hybrid*), Affinitätsanalysen und Coimmunopräzipitation, ein Effekt auf die Dimerisierung gezeigt (Kondo et al. 2003; Fan et al. 2007; Raevaara et al. 2005; Nystrom-Lahti et al. 2002; Gargiulo et al. 2009), was die Theorie unterstützte, dass die Dimerisierungsfläche von der innenliegenden Subdomäne gebildet wird. Jedoch könnte es bei dieser sehr stark destabilisierenden Veränderung zu einem Ausfall der Dimerisierung aufgrund einer partiellen Entfaltung kommen, da ein Prolin in die  $\alpha$ -Helix eingefügt wird, das diese unterbricht (Abbildung 39). Der Ausfall der Dimerisierung würde

somit nicht auf der spezifischen Veränderung der Interaktionsfläche beruhen. Dies wird dadurch bestätigt, dass die beiden anderen Veränderungen an dieser Position (R659L und R659Q), die ebenfalls untersucht wurden, PMS2 stabilisierten.

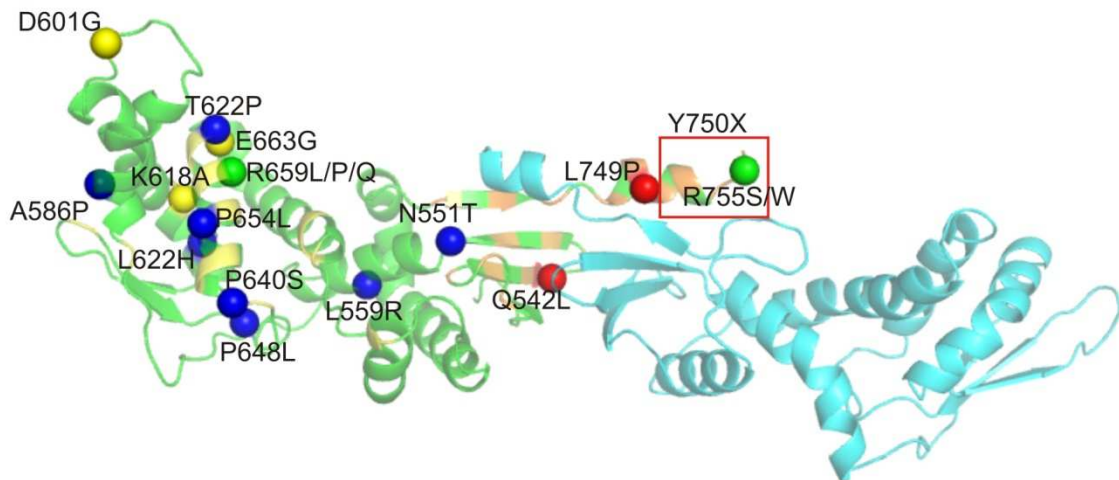


Abbildung 39: Lage der untersuchten Missense-Veränderungen in der Proteinstruktur und ihre Auswirkungen auf die Dimerisierung. MLH1 ist grün, PMS2 ist blau. Die Varianten, die die Dimerisierung beeinflussen sind rot gefärbt. Die Varianten, die keinen Effekt auf die Dimerisierung zeigten sind gelb und die Varianten, für die geringe MLH1-Mengen detektiert wurden, sind blau markiert. Die Deletionsvariante Y750X ist mit einem Kasten gekennzeichnet. Die Aminosäuren R659 und R755 sind grün gefärbt, da an diesen Positionen mehrere Veränderungen mit verschiedenen MLH1-Expressionen untersucht wurden. Die von Kosinski et al. vorgeschlagene Interaktionsfläche (Kosinski et al. 2008) ist in orange gekennzeichnet, die von Guarne et al. und Cutalo et al. vorgeschlagene (Guarne et al. 2004; Cutalo et al. 2006) gelb.

Die von Dr. Jan Kosiński durchgeführte bioinformatische Analyse bestätigte die experimentellen Ergebnisse. Typische Kennzeichen von Protein-Protein-Interaktionsflächen sind die Konservierung dieser Bereiche zwischen homologen Proteinen (Valdar and Thornton 2001) und das Auftreten eines stark hydrophoben Bereichs (Nooren and Thornton 2003; Tsai et al. 1997; Young et al. 1994). Die von Kosinski et al. vorgeschlagene Dimerisierungsfläche trägt diese beiden Merkmale, die zuvor vorgeschlagene Dimerisierungsfläche aus den innenliegenden Subdomänen nicht. Die Dimerisierung über die innenliegenden Subdomänen (die „alte“ Dimerisierungsfläche) wurde aufgrund der Ergebnisse von Oberflächenmodifikationsexperimenten vorgeschlagen (Cutalo et al. 2006). In dem Experiment wurden drei Lysine in der C-terminalen Domäne identifiziert, die im Dimer verborgen sind, im Gegensatz dazu aber im Monomer sichtbar. Diese Ergebnisse können jedoch auch damit erklärt werden, dass es weitere proteininterne Interaktionen mit der N-terminalen Domäne oder mit der

Linkerregion gibt, oder dadurch, dass es in Folge der Dimerisierung zu Konformationsänderungen kommt, die zu einer „Verdeckung“ der Lysine führen.

Obwohl für die drei Varianten gezeigt wurde, dass PMS2 nicht stabilisiert wird, kam es nicht zu einem vollständigen Bindungsverlust. Sowohl in der Coimmunopräzipitation, als auch mit der Vernetzung durch BS<sup>3</sup> war eine Dimerbildung nachweisbar, auch wenn diese aufgrund der geringen PMS2-Menge nicht quantifiziert werden konnte. In der Vernetzung von C-terminalem MLH1 und PMS2 konnte gezeigt werden, dass MLH1 ein Homodimer bildet (Abbildung 24). *In vivo* bildet MLH1 nicht nur mit PMS2 Heterodimere, sondern auch mit PMS1 und MLH3. PMS1 wird genau wie PMS2 von MLH1 stabilisiert und liegt etwa 10-mal seltener in der Zelle vor als PMS2 (Raschle et al. 1999). MLH3 hingegen ist auch ohne MLH1 stabil, ist jedoch 60-mal seltener in der Zelle vorhanden als PMS2 (Cannavo et al. 2005). Wenn PMS2 nicht ausreichend stabilisiert wird, könnte es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts unter den Bindungspartnern in Richtung von MLH3 kommen, da MLH3 nicht von MLH1 stabilisiert werden muss. Außerdem könnte MLH1 auch *in vivo* als Monomer und als Homodimer vorliegen.

Zusammenfassend wurde anhand experimenteller und bioinformatischer Methoden gezeigt, dass die Dimerisierungsfläche des humanen MutL $\alpha$  von den außenliegenden Subdomänen gebildet wird (Kosinski et al. 2008) und nicht von den innenliegenden Subdomänen (Guarne et al. 2004; Cutalo et al. 2006).

Für diese drei stabilen MLH1-Varianten wurde somit die molekulare Ursache der *Mismatch*-Reparatur aufgeklärt. Die Variante Y750X wurde in mehreren Patienten in Großbritannien und China detektiert (Syngal et al. 1999; Stone et al. 2001; Wang et al. 2006), jedoch sind keine Kosegregationsanalysen vorhanden. Die Variante Q542L wurde bei koreanischen Patienten nachgewiesen (Han et al. 1995; Shin et al. 2004) auch für diese Variante liegen keine Informationen über Kosegregationsanalysen vor. Q542L wurde in verschiedenen Studien mit unterschiedlichem Ergebnis untersucht: mehrere Gruppen konnten keinen Effekt auf die MLH1-Funktion nachweisen (Guerrette et al. 1999; Kondo et al. 2003; Shimodaira et al. 1998), andere Gruppen stuften die Variante als schädlich ein (Takahashi et al. 2007; Ellison et al. 2001). Neben der geringen Stabilisierung von PMS2 wurde in den Experimenten mit stark überexprimiertem MutL $\alpha$  eine Reparaturfähigkeit von unter 40 % detektiert. Dadurch, dass *in vivo* die Verfügbarkeit von MutL $\alpha$  durch die mangelnde Stabilisierung durch MLH1 eingeschränkt wird, wird sich die Reparaturaktivität weiter verringern. Für die anderen beiden Varianten wurden noch geringere Reparaturaktivitäten von 10 % und 15 % bestimmt, so dass alle drei Varianten als pathogen eingestuft werden können.

### 4.3 DIE REDUZIERTER MLH1-EXPRESSION BERUHT AUF VERMINDERTER PROTEINSTABILITÄT

Bevor der Einfluss der reduzierten MLH1-Menge auf die Ausprägung des Lynch-Syndroms analysiert wurde, wurde die Ursache der reduzierten Expression untersucht. Um auszuschließen, dass die verminderte Proteinmenge in den Experimenten in einer geringeren Transkriptmenge begründet ist, wurde eine quantitative *real time*-PCR durchgeführt. Es wurde demonstriert, dass die Transkriptmengen der verschiedenen Varianten etwa gleich groß sind. Weiterhin wurde gezeigt, dass in den *HEK293T*-Zellen, die MLH1 überexprimieren, mehr als 500-mal mehr Transkript vorliegt, als in den *HEK293*-Zellen, die über endogenes MLH1 verfügen. Diese Unterschiede der Transkriptmengen spiegeln sich nicht in den Proteinmengen wieder: die MLH1-transfizierten *HEK293T*-Zellen wiesen ca. 50-mal so viel MLH1-Protein auf, wie die *HEK293*-Zellen endogenes MLH1. Vermutlich ist in den transfizierten Zellen so viel MLH1-Transkript vorhanden, dass viele Transkripte nicht translatiert werden. Das würde bedeuten, dass die Transkriptmenge durch die starke Überexpression nicht kritisch ist für die Proteinmenge.

Die Proteinstabilität der Varianten wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. Die Ergebnisse der Methoden unterscheiden sich etwas. Keine der verwendeten Methoden spiegelt die natürliche Situation wieder und mit den verschiedenen Methoden wurden unterschiedliche Parameter getestet. Es wurde daher versucht, die Destabilisierung mit anderen Methoden zu verifizieren und den geeignetsten Assay zu finden.

Da Aminosäureaustausche, die Proteinstabilität durch die Entstehung (lokaler) Fehlfaltungen beeinflussen können, die Proteine einerseits für den proteolytischen Abbau bestimmen und gleichzeitig die thermische Stabilität beeinflussen (Parsell and Sauer 1989), wurden zwei ganz unterschiedliche Assays verwendet. Während der *Pulse-Chase*-Assay die Proteindegradation im proteolytischen Abbau darstellt, wird im *Thermal-Shift*-Assay die thermische Stabilität beobachtet. Im *Pulse-Chase*-Assay wurde *in vitro* transkribiertes und translatiertes Protein eingesetzt, während für den *Thermal-Shift*-Assay aufgereinigtes MLH1 verwendet wurde. Außerdem wurde im *Pulse-Chase*-Assay der Abbau des Dimers beobachtet, PMS2 wurde ebenfalls *in vitro* transkribiert und translatiert, während im *Thermal-Shift*-Assay die Entfaltung des MLH1-Monomers untersucht wurde. Auch wenn die beiden Assays unterschiedliche Ergebnisse zeigten und sich von den Ergebnissen der Expressionsanalyse unterschieden, so konnte doch gezeigt werden,

dass alle fünf untersuchten Varianten instabil sind. Die Variante A681T war am stärksten destabilisiert. Sie wies die geringste Halbwertszeit im *Pulse-Chase*-Assay auf und konnte im Thermal-Shift-Assay nicht eingesetzt werden, da sie in *Sf9*-Zellen nicht ausreichend exprimiert wurde.

#### 4.4 DIE VERWENDETEN ALGORITHMEN SAGEN DIE PATHOGENITÄT AUFGRUND VON REDUZIERTER PROTEINSTABILITÄT NICHT VORAUS

Unterschiedliche Algorithmen wurden verwendet, um zu untersuchen, ob sie mit den Ergebnissen der Experimente übereinstimmen und somit eine (zumindest tendenziell) richtige Pathogenitätsvorhersage möglich ist. Die Vorhersage von MAPP-MMR korrelierte am besten mit den Ergebnissen der Experimente und wurde deshalb auf alle Varianten angewendet (siehe 3.3.3). Der Algorithmus erzeugte für reparaturdefiziente Varianten durchgehend hohe Werte, was mit hoher Pathogenitätswahrscheinlichkeit assoziiert ist. Diese wurden somit korrekt erkannt. Die Pathogenität infolge reduzierter Stabilität wurde jedoch nicht erkannt. Da die Vorhersage von MAPP-MMR auf der Konservierung einzelner Aminosäuren in homologen Sequenzen beruht, war zu erwarten, dass der Austausch von Aminosäuren, die eine katalytische Funktion übernehmen, besser vorausgesagt werden kann, da diese meist stärker konserviert sind. Die Dimerisierungsvarianten L749P und Q542L weisen sehr hohe, L749P sogar den höchsten berechneten Wert, auf.

In die Analyse von MAPP-MMR fließen neben der Konservierung auch Eigenschaften der betreffenden Aminosäuren ein, wie die Ladung oder die Hydrophathie. Die Einschätzungen von SIFT, PANTHER und PolyPhen beruhen ebenfalls auf Sequenzhomologien, auch wenn teilweise noch andere Parameter einfließen. Auch diese Programme zeigten die Tendenz, die bekannten pathogenen Varianten zu identifizieren. Der Algorithmus CUPSAT soll explizit die Auswirkungen von Aminosäurewechsellern auf die Stabilität vorhersagen, die Ergebnisse korrelierten jedoch nicht mit den Ergebnissen der Experimente. Die Ergebnisse bekräftigen, dass es der *in silico*-Vorhersage der Stabilität an Genauigkeit fehlt (Potapov et al. 2009). Für die Vorhersage der Reparaturfähigkeit kann MAPP-MMR jedoch im Rahmen der Untersuchung einer Variante herangezogen werden: ein hoher Wert ist ein guter Indikator für Pathogenität, niedrige Werte haben jedoch eingeschränkte Aussagekraft.

#### 4.5 IM MMR-ASSAY SIND 50 % DES ENDOGENEN MLH1 FÜR EINE EFFEKTIVE REPARATUR AUSREICHEND

Um zu untersuchen, wie sich reduzierte Verfügbarkeit von MLH1 sich *in vitro* auf die Reparatur auswirkt, wurde die endogene MLH1-Menge reduziert. Zunächst wurde erwartet, dass die Reparatureffizienz mit der MLH1-Menge korreliert, jedoch waren die detektierten Reparaturaktivitäten bis zu einem MLH1-Gehalt von 40 - 50 % gleich hoch, bei geringeren MLH1-Mengen sank die Reparatur deutlich. 50 % MutL $\alpha$  reichten aus, um die maximal mögliche Reparatur zu gewährleisten, die Reaktion war dann bereits gesättigt. Es wurde beschrieben, dass die beiden MLH1-Allele beim gesunden Menschen in gleichem Maße transkribiert werden, die Abweichungen lagen zwischen 44,7 % und 55,3 % (Tournier et al. 2004). Zu einem gerichteten Abbau von Transkripten (*nonsense mediated decay*) kann es kommen, wenn durch vorzeitige Stopp-Codons „nonsense“-mRNA entsteht. In diesem Fall würde es zu einer Störung der Balance zwischen der Transkripten der beiden Allele kommen, da die „nonsense“-Transkripte abgebaut werden und die „gesunden“ Transkripte nicht. Es wurde gezeigt, dass bei Missense-Mutationen, bei denen kein Transkriptabbau erwartet wird, eine normale allelische Verteilung der Transkripte vorliegt (Santibanez Koref et al. 2010). Das heißt, ein heterozygoter Träger einer inaktivierenden MLH1-Missense-Mutation wird intrazellulär 50 % aktives MLH1 aufweisen. Solange es nicht zum Verlust des zweiten Allels kommt, reicht die Reparatur aus, damit es nicht zur Tumorentstehung kommt. Unter natürlichen Verhältnissen scheinen 50 % aktives MLH1 zu genügen, um die korrekte Replikation zu gewährleisten, da es in heterozygoten Trägern von MLH1-Keimbahnmutationen kaum systemisch zu MSI kommt. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass auch das Normalgewebe dieser Patienten eine sehr geringe Mikrosatelliteninstabilität aufweist (De Grassi et al. 2010; Coolbaugh-Murphy et al. 2010). Dies weist darauf hin, dass die Reparatur zwar nicht zu 100 % effizient verläuft, jedoch ausreicht, um die Tumorentstehung zu verhindern, die erst durch den Wegfall des zweiten Allels ausgelöst wird.

#### 4.6 DIE VERMINDERTE EXPRESSION KORRELIERT MIT DEM AUFTRETEN KLINISCHER EFFEKTE

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die reduzierten MLH1-Mengen auf einer verminderten Proteinstabilität beruhen, blieb jedoch die Frage, wie sich die reduzierte Expression in ein Risiko, Tumore zu entwickeln, übersetzt. Deshalb wurden zu den



ausgewählten fünf Varianten mit reduzierter Stabilität klinische Daten gesammelt. Als Referenz wurden auch für die fünf pathogenen Varianten klinische Daten zusammengestellt. Von der Arbeitsgruppe der IARC (*International Agency for Research on Cancer*) wird gefordert, dass verwendete Assays mit klinischen Daten validiert werden sollen (Goldgar et al. 2008) d.h., dass gezeigt werden soll, dass für bestimmte Messergebnisse ein klinischer Effekt nachgewiesenermaßen auftritt, bzw. nicht auftritt. Klinische Daten von 345 Patienten, die Träger einer der 10 untersuchten Keimbahn-Veränderungen sind, wurden ausgewertet. Zunächst wurden drei Parameter betrachtet: das Alter der Träger einer Variante bei Diagnose, das Erfüllen der Amsterdam-Kriterien und ob für einen Tumor MSI detektiert wurde. Das Alter bei der Diagnose eines Tumors wird für Träger einer *MLH1*-Mutation mit 43 Jahren (Jang and Chung 2010) oder sogar mit 40 Jahren (Goecke et al. 2006) angegeben, während das durchschnittliche Erkrankungsalter für sporadische Kolon-Karzinome bei 69 Jahren liegt (Lynch et al. 2009). Die Amsterdam-Kriterien (Vasen et al. 1999) sollen helfen, Patienten mit Krebserkrankungen mit starker erblicher Komponente zu identifizieren. Die Kriterien haben eine Sensitivität von 78 % und eine Spezifität von 61 % (Syngal et al. 2000). Die Sensitivität gibt an, bei welchem Prozentsatz erkrankter Patienten die Erkrankung durch die Kriterien erkannt wurde. Die Spezifität gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass Patienten, die nicht unter dem Syndrom leiden, auch als negativ eingestuft werden. Nach wie vor ist die Analyse des Mikrosatellitenstatus des Tumors eine der wichtigsten Untersuchungen in der Diagnose des Lynch-Syndroms, da 90 % der Lynch-Tumore MSI aufweisen, jedoch nur 15 % der sporadischen Tumore (Jasperson et al. 2010).

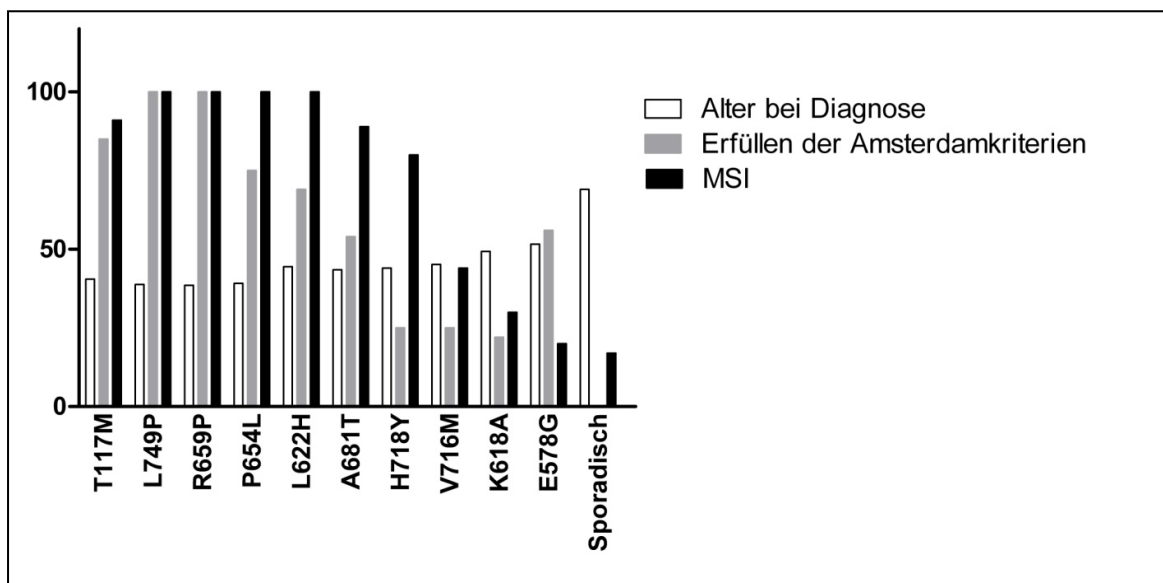


Abbildung 40: Klinische und molekulargenetische Marker bei Karzinompatienten mit verschiedenen *MLH1*-Veränderungen. Übersicht über das Durchschnittsalter bei Diagnose der Karzinomerkkrankung (in Jahren), das Erfüllen der Amsterdam-Kriterien (Anteil an allen bekannten Fällen in %) und den Anteil der Patienten, deren Tumore MSI aufweisen (Anteil an allen bekannten Fällen in %), im Vergleich zu sporadischen Tumoren.

In Abbildung 40 sind die drei Parameter im Diagramm dargestellt. Auf der linken Seite sind die pathogenen Kontrollen gezeigt. Die fünf Varianten mit reduzierter MLH1-Expression wurden nach dem Auftreten von MSI zwischen die pathogenen Kontrollen und die sporadischen Fälle einsortiert.

Von den Varianten mit reduzierter Expression wurde für die MLH1-Variante A681T der höchste Anteil an MSI-positiven Fällen beschrieben, für E578G der geringste. Für die Varianten, die als pathogene Kontrollen fungierten, wurde in fast allen Fällen MSI im Tumor nachgewiesen. Das Alter steigt zwischen A681T und E578G leicht an, die Fälle, die die Amsterdam-Kriterien erfüllen, nehmen ab. Eine Ausnahme bildet die Variante E578G. Die Amsterdam-Kriterien wurden in vielen der beschriebenen Fälle erfüllt. Die Werte sind in Tabelle 8 angegeben, ebenso die Fallzahlen.

Im nächsten Schritt wurde nach Fällen gesucht, für die es Angaben zu weiteren Parametern gibt, die bei der Pathogenitätsklärung interessant sein können. Diese Parameter sind: Verlust von MLH1 im Tumor, die proximale Lokalisierung des Tumors, das homozygote Vorkommen von Varianten, die Frequenz in Kontrollgruppen, das gleichzeitige Vorkommen von anderen, pathogenen Mutationen (*co-occurrence*), gleichzeitiges Vorkommen der Variante und Auftreten des Tumors (Kosegregation) und Fall-Kontroll-Analysen. Diese Art der klinischen Daten kann für die Pathogenitätsklärung sehr aufschlussreich sein, existiert jedoch nur für wenige Fälle.

Während einige dieser Angaben nur einen starken Hinweis auf das Lynch-Syndrom geben, können andere es praktisch ausschließen. Der Verlust von MLH1 im Tumor deutet auf das Lynch-Syndrom hin, jedoch kann es auch durch die Hypermethylierung des MLH1-Promotors zum Verlust von MLH1 kommen (Kane et al. 1997). Ebenso verhält es sich mit der proximalen Lokalisierung. Tumoren im Kolon von Patienten mit *MLH1*- oder *MSH2*-Mutationen sind meistens proximal (rechtsseitig) lokalisiert, während sporadisch auftretende Kolon-Tumoren häufiger eine linksseitige Lokalisierung zeigen (Jass 2004). Das Auftreten an einer anderen Position ist jedoch kein Ausschlusskriterium. Beim homozygoten Auftreten einer Variante hingegen kann davon ausgegangen werden, dass diese Variante nicht das Lynch-Syndrom auslöst, denn man würde erwarten, dass biallelische Träger einer inaktivierenden Mutation unter dem *constitutive MMR deficiency syndrome* leiden würden (Wimmer and Kratz 2010). Dieses Syndrom weist einen deutlich schwereren Erkrankungsverlauf und ein wesentlich früheres Erkrankungsalter auf.

Da beim Vorkommen einer zweiten pathogenen Mutation in der Regel nicht bekannt ist, ob sich die zweite Mutation in *cis* oder in *trans* zu der untersuchten Variante befindet, kann nicht zwingend darauf geschlossen werden, dass die untersuchte Variante nicht pathogen ist. Jedoch wird das häufige Auftreten pathogener Zweitmutationen als starker

Hinweis auf die Apathogenität der Erstmutation gewertet. Kosegregationsanalysen geben Aufschluss darüber, ob die Träger der Variante und die erkrankten Personen in einer Familie übereinstimmen. Für aufschlussreiche Kosegregationsanalysen sind jedoch ausreichende Fallzahlen nötig.

Tabelle 8: Zusammenfassung der klinischen Daten für die ausgewählten MLH1-Varianten. Daten von 345 Fällen, von Trägern einer der zehn Varianten, wurden in der Literatur gefunden. Durchschnittsalter bei Diagnose (in Jahren), Anteil amsterdampositiver Fälle (in %), Anteil an Tumoren die MSI aufwiesen (in %), Anteil der Tumore die einen Verlust von MLH1 zeigten (in %), Anteil der Kolon-Karzinome mit proximaler (rechtseitiger) Lokalisation (in %), Frequenz in den Kontrollgruppen (in %), Beschreibung von Kosegregation, homozygoten Fällen, dem Vorkommen anderer Mutationen und beschriebene von Fall- Kontroll-Analysen wurden aufgelistet. Ergebnisse mit kleinen Fallzahlen wurden in Klammern gesetzt. Die Varianten, die als pathogene Kontrollen fungierten, sind dunkel unterlegt. Die Variante A681T wurde auf Grund der klinischen Daten zu der Variante L622H gruppiert, für die eine geringere Manifestationswahrscheinlichkeit beschrieben wurde. Fälle bei denen eine zweite pathogene Mutation nachgewiesen wurde, gingen in die Gesamtzahl der Fälle ein, jedoch nicht in die Berechnung der anderen Werte. Eine Auflistung der Fälle und der entsprechenden Referenzen findet sich im Anhang (Tabelle A5), die Zahlen in den eckigen Klammern bezeichnen die Referenz.

Variante	MA-P- MMR Wert	Expression (293T)	In-vitro Reparatur	Fälle #	Alter bei Diagnose Jahre/Fälle	Ansterdam positiv %/Fälle	MSI %/Fälle	Verlust von MLH1 in IHC %/Fälle	Proximale Lokalisation %/Fälle	Frequenz in Kontrollen %/Anzahl	Kosegregation	Homozygote Fälle	Vorkommen anderer Mutation	Fall- Kontroll- Analyse
<b>K618A</b>	5,06	<b>78</b>	<b>92</b>	123	<b>49.3</b>	<b>22</b>	<b>30</b>	<b>26</b>	<b>55</b>	<b>0.69</b>	Nein (1, [26]) Nein (3, [40]) Nein (4, [74]) Ja/Nein (2/2, [68])	1 Fall zusammen- gesetzt [40]	10% (12)	nicht pathogen [53, 62, 66, 73, 74]
<b>E578G</b>	4,85	<b>71</b>	<b>89</b>	11	<b>51.6</b>	<b>9</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>0.00</b>	Ja (2, [29]) Nein (1, [29])		18% (2)	
<b>V716M</b>	2,78	<b>61</b>	<b>88</b>	54	<b>45.2</b>	<b>25</b>	<b>44</b>	<b>38</b>	<b>56</b>	<b>0.21</b>	Ja [30] Nein (5, [89]) Nein (4, [88])	2 gesunde Kontrollen [89]	19% (10)	
<b>H718Y</b>	3,45	<b>73</b>	<b>106</b>	20	<b>44.0</b>	<b>4</b>	<b>80</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>0.84</b>		1 Fall [99] 1 Kontrolle [91]	20% (4)	
<b>A681T</b>	4,41	<b>52</b>	<b>95</b>	43	<b>43.5</b>	<b>54</b>	<b>89</b>	<b>100</b>	<b>86</b>	<b>0.00</b>	Ja (11, [53]) Ja (5, [81])			
<b>L622H</b>	12,90	<b>42</b>	<b>80</b>	23	<b>44.5</b>	<b>69</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>57</b>		Ja (15, [75]) Ja (3, [51,52])			
<b>T117M</b>	21,05	<b>44</b>	<b>5</b>	38	<b>40.5</b>	<b>85</b>	<b>91</b>	<b>100</b>	<b>71</b>				3% (1)	
<b>P654L</b>	19,20	<b>25</b>	<b>67</b>	20	<b>39.2</b>	<b>75</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>77</b>		Ja (9, [24])			
<b>L749P</b>	37,37	<b>85</b>	<b>11</b>	8	<b>38.8</b>	<b>100</b>	(100)	<b>50</b>	(100)					
<b>R659P</b>	11,70	<b>13</b>	<b>4</b>	5	<b>38.5</b>	(100)	<b>100</b>	-100	(67)					

Die zusammengetragenen Daten sind ebenfalls in Tabelle 8 erfasst, eine Tabelle mit allen Fällen, die in Tabelle 8 eingingen, findet sich im Anhang, genauso wie die zugehörigen Referenzen.

Die Daten, die zu Trägern der pathogenen Kontrollen gefunden wurden, bestätigen die Pathogenität, nicht nur bei dem Erfüllen der Amsterdam-Kriterien und MSI im Tumor. Der Verlust von MLH1 im Tumor, nachgewiesen durch eine Immunhistochemie (IHC), ist, außer für L749P, in allen Fällen detektiert worden. Da die Variante L749P gut exprimiert wird, jedoch nicht repariert und PMS2 nicht stabilisiert (siehe 3.2.1), ist es wahrscheinlich, dass im Tumor MLH1 nachweisbar ist, auch wenn keine Reparatur erfolgt. Die Frequenz in Kontrollgruppen und homozygote Fälle sind nicht beschrieben. Das Vorkommen einer pathogenen Zweitmutation ist nur für T117M in einem Fall geschildert worden. Die Variante L622H, für die eine verminderte Penetranz ermittelt wurde, setzt sich von den anderen Varianten durch ein leicht erhöhtes Durchschnittsalter ab.

Es wurden nichtpathogene und pathogene Varianten mit Stabilitätsverlust identifiziert. Die Varianten K618A, E578G, V716M und H718Y wurden als nichtpathogen eingestuft. Verschiedene Merkmale wurden beschrieben, die gegen die Einordnung als Lynch-Syndrom-Mutation sprechen: negative Kosegregation wurde für K618A (Tannergard et al. 1995; Blasi et al. 2006; Castillejo et al. 2011; Sanchez de Abajo et al. 2005), E578G (Liu et al. 1999) und V716M (Lagerstedt Robinson et al. 2007; Marcos et al. 2006; Kamory et al. 2006) gezeigt, homozygote Fälle und Kontrollen für K618A (Blasi et al. 2006), V716M (Kamory et al. 2006) und H718Y (Kowalski et al. 1997; Terdiman et al. 2001), das Vorkommen anderer pathogener Mutationen wurde für alle vier Varianten beschrieben, ebenso wie der Verlust von MLH1 im Tumor nur zu einem geringen Prozentsatz. Außerdem wurde K618A in 5 Kontroll-Fall-Analysen als nicht pathogen beschrieben (Barnetson et al. 2008; Christensen et al. 2008; Nejda et al. 2009; Kurzawski et al. 2006; Castillejo et al. 2011).

Zwar wurden diese Varianten als nichtpathogen eingeordnet, jedoch ist es auffällig, dass eine große Differenz zu den Werten für sporadische Tumoren besteht. Besonders deutlich wird dies bei der Angabe des Alters: die Angaben liegen zwischen 45 und 50 Jahren, sporadischer Darmkrebs hingegen wird durchschnittlich mit 69 Jahren diagnostiziert (Jasperson et al. 2010). Diese Differenz wird durch eine Vorauswahl hervorgerufen, der die Patienten unterliegen, bei denen ein erblicher Hintergrund vermutet wird. In der Regel wird ein erblicher Hintergrund eines Karzinoms vermutet, wenn der Patient jünger ist als 50 Jahre. Auch in den Amsterdam-Kriterien wurde festgelegt, dass einer der Betroffenen die Diagnose vor dem 50. Lebensjahr erhalten haben muss (Vasen et al. 1991). Somit ist durch den „*preselection bias*“ das niedrige Erkrankungsalter bereits vorgegeben.

Die Variante A681T nimmt unter den Varianten mit reduzierter Expression eine Sonderstellung ein. Die Träger dieser Variante zeigen nicht nur das geringste Durchschnittsalter bei Erkrankung und den höchsten Anteil von MSI-Tumoren, hier wurde der Verlust von MLH1 im Tumor in 100 % der Fälle gezeigt, 86 % der Tumoren sind proximal lokalisiert und zwei Studien haben Kosegregation in insgesamt 16 Fällen beschrieben. Aufgrund dieses Bildes wurde diese Variante als krankheitsauslösend eingestuft und zu der pathogenen Variante L622H sortiert. Genau wie bei L622H konnte Kosegregation beobachtet werden. Diese beiden Varianten heben sich jedoch von den anderen pathogenen Kontrollen durch ein höheres Durchschnittsalter bei der Diagnose ab.

Die Daten weiterer Varianten, die zwar eine hohe Reparaturaktivität, jedoch eine reduzierte Expression zeigen, weisen darauf hin, dass die Varianten mit einer geringeren Expression als A681T pathogen sind. Die Variante P640S wurde in zwei Familien beschrieben, wo gezeigt werden konnte, dass die Variante Kosegregation mit der Krankheit zeigt (Shin et al. 2004; Giraldo et al. 2005). P648L wurde in einer deutschen Familie bei zwei Patienten gefunden. Bei einem der Patienten wurden Mikrosatellitenstatus und MLH1-Expression im Tumor untersucht und es zeigten sich der Verlust von MLH1 und daraus resultierend eine MSI. Vergleichsweise viele Untersuchungen gibt es zu einer anderen Variante an dieser Position. Die Variante P648S ist ebenfalls wenig exprimiert, zeigte Reparaturaktivität und wurde in einem Kind mit konstitutiver MMR-Defizienz gefunden (Raevaara et al. 2004). Die Variante L559R wurde in italienischen Patienten mit MSI und ohne MLH1 im Tumor, 35 und 63 Jahre alt, (Belvederesi et al. 2006; Bianchi et al. 2007) und in einem Patienten aus Großbritannien (Taylor et al. 2003) detektiert. Während drei Varianten (P640S, P648L und L559R) geringere Expression als A681T zeigten, wurde für N551T eine vergleichbare Expression detektiert. Diese Variante wurde in einem Amsterdam-positiven 46-jährigen Patienten mit MSI im Tumor gefunden (Hutter et al. 1998), auch wurde die Kosegregation in einer türkischen Familie mit drei Patienten und der Tod eines 13-jährigen Kindes mit heterozygoten Eltern (vermutlich ein Fall von konstitutiver MMR-Defizienz) (Wang et al. 1997) beschrieben.

Die Aussage der klinischen Daten und die Ergebnisse der Experimente korrelieren. Für die als pathogen eingestufte Variante A681T wurde ein geringeres Expressionslevel (52 %) als für die anderen Varianten (mindestens 64 %) ermittelt, außerdem zeigte sie in den weiteren Untersuchungen die geringste Stabilität.

Es wurden zwei Varianten detektiert (V716M und A681T), die sich in der Expression lediglich um 12 % unterscheiden, von denen eine Variante das Lynch-Syndrom auslöst (A681T), die andere keinen krankmachenden Einfluss hat (V716M). Zunächst scheint es

unerwartet, dass Varianten, die sich klinisch so stark unterscheiden, in den experimentellen Werten so dicht zusammen liegen. Zwei Punkte könnten diese Situation erklären. Erstens wird in den Experimenten die biologische Situation nur zum Teil wiedergegeben. Schon die Ergebnisse der verschiedenen Experimente unterscheiden sich: während A681T eine 12 % geringere Expression aufweist, wurde im Puls-Chase-Assay ein Abbau detektiert, der 19 % schneller ist, als der der anderen Varianten. Außerdem wurden die Proteine in den Experimenten stark überexprimiert, dies könnte dazu führen, dass die proteolytische Maschinerie überladen ist. So könnte der Unterschied zwischen den untersuchten Varianten unter natürlichen Bedingungen noch größer ausfallen. Dafür spricht auch, dass bei Trägern von pathogenen Varianten, wie auch bei A681T, kein MLH1 im Tumor nachgewiesen werden konnte, während bei Trägern der anderen Varianten häufig MLH1 im Tumor detektiert wurde. Desweiteren konnte A681T, im Gegensatz zu den anderen Varianten, nicht in *Sf9*-Zellen exprimiert werden. Zweitens kann es bei Varianten, die eine reduzierte Expression aufweisen, jedoch keinen vollständigen Verlust von MLH1 zeigen, zu einem abgeschwächten Phänotyp kommen. Eine Tendenz lässt sich aus den klinischen Daten ableiten (A681T<L622H<P654L) und für L622H wurde eine abgemilderte Form des Lynch-Syndroms beschrieben (Borras et al. 2010). Sammlungen klinischer Daten mit größeren Fallzahlen könnten zeigen, ob sich die Schwere des Lynch-Syndroms oder die Wahrscheinlichkeit, dass es zur Tumorbildung kommt, mit dem Grad der Instabilität von MLH1-Varianten korrelieren lässt. A681T ist, unter den genauer untersuchten Varianten, die Variante, deren Instabilität gerade ausreicht, um das Lynch-Syndrom auszulösen. Durch die Identifizierung der „Grenz“-Varianten in der MLH1-Expression konnte zum ersten Mal ein Assay, der zur Untersuchung von nichtklassifizierten Varianten verwendet wird, validiert werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, durch Experimente geschaffene Informationen zur Bewertung von Varianten einzusetzen.

#### 4.7 DIE PATHOGENITÄT AUFGRUND VON VERMINDERTER EXPRESSION KANN MIT DEN „GRENZ“-VARIANTEN BEWERTET WERDEN

Nachdem pathogene und nicht pathogene Varianten mit reduzierter MLH1-Stabilität identifiziert wurden, können diese „Grenz“-Varianten eingesetzt werden, um die Varianten aus dem Screening einzuordnen (Abbildung 41). Die Variante A681T markiert dabei die Grenze zur nicht mehr ausreichenden MLH1-Menge, die Variante V716M die Grenze zur ausreichenden MLH1-Menge.

24 Varianten aus dem Screening zeigten eine geringere Expression als A681T auf, bei 16 Varianten ist die Expression signifikant geringer (Tabelle A2, Anhang). Die Expression dieser Varianten ist also zu gering für eine ausreichende Reparatur. Die Expression von acht Varianten weist Werte zwischen denen der „Grenz“-Varianten auf. Für diese Varianten kann keine Aussage über die Pathogenität aufgrund der reduzierten Expression getroffen werden. Für 26 Varianten wurde ein höheres Expressionsniveau als das von V716M bestimmt. Diese Varianten verfügen demnach über eine ausreichende Expression.

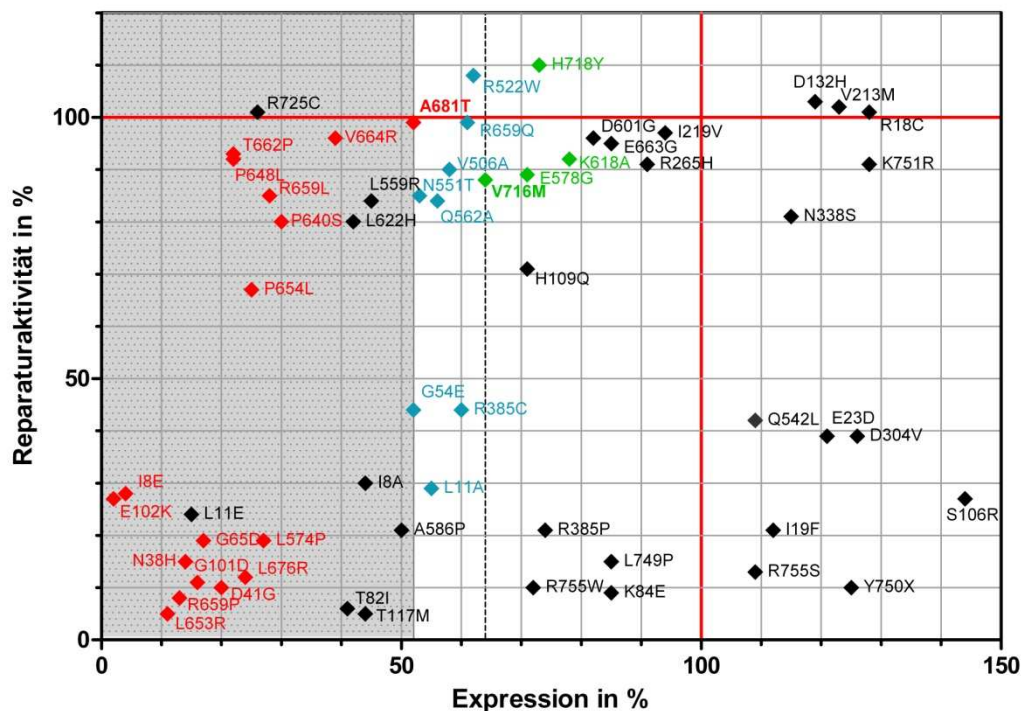


Abbildung 41: Beurteilung der Pathogenität der Varianten aufgrund von reduzierter Expression. Für die Variante A681T wurde gezeigt, dass sie pathogen ist, für die Varianten die grün markiert sind, dass sie neutral sind. Die Varianten aus dem Screening wurden mit Hilfe dieser „Grenz“-Varianten eingeordnet. Der Bereich mit einer geringeren Expression als A681T ist grau gekennzeichnet. Die Varianten in diesem Bereich, die sich in ihrer Expression signifikant von A681T unterscheiden, sind in rot hervorgehoben. Die Varianten, die eine Expression zwischen den beiden „Grenz“-Varianten aufwiesen, sind in blau gekennzeichnet. Die Linie markiert die Expression von V716M.

Eine Validierung der bestimmten Reparaturaktivitäten mit klinischen Daten erfolgte nicht. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass Varianten, die *in vitro* geringe Reparaturaktivitäten aufweisen, auch *in vivo* nicht reparieren. Da die Defizienz der mit dem MMR-Assay untersuchten Reparaturfunktion als Ursache des Lynch-Syndroms anerkannt ist, kann, insbesondere wenn die Reparaturfunktion völlig verloren gegangen ist, das System für die Bewertung der Pathogenität herangezogen werden (Goldgar et al.



2008). Für die Untersuchung anderer Syndrome mit einer großen Anzahl von VUS ist kein Assay verfügbar, der die katalytische Funktion des Proteins in solcher Weise repräsentiert. Die Brustkrebsdisposition, die durch BRCA1 und BRCA2 ausgelöst wird, ist ein Beispiel, da die Krankheit nicht auf die Störung eines spezifischen Vorgangs zurückzuführen ist, der in einem Assay getestet werden kann (Goldgar et al. 2008).

Auch die Varianten, die eine ausreichende Expression und volle Reparaturaktivität zeigten, können nicht automatisch als neutral klassifiziert werden. Für die Veränderungen V716M, H718Y, K618A und E578G konnte anhand der vorhandenen klinischen Daten gezeigt werden, dass sie neutral sind (siehe Absatz 4.6). Weiterhin könnte die Kombination von Varianten, die alleine nicht krankmachend sind, zu einem erhöhten Karzinomrisiko führen, wenn sich die Effekte verschiedener Veränderungen summieren (Martinez and Kolodner 2010).

#### 4.8 NICHT KLASSIFIZIERTE MISSENSE-VARIANTEN SOLLTEN ZUERST AUF EINE AUSREICHENDE EXPRESSION GETESTET WERDEN

Die unzureichende Expression ist ein Schlüsselproblem von MLH1-Varianten, dies konnte im Screening gezeigt werden und wurde bereits in anderen Studien berichtet (u.a. (Raevaara et al. 2005; Takahashi et al. 2007; Hardt et al. 2011)). Daher sollte die Ermittlung der Expression bei der Bestimmung der Pathogenität einer nichtklassifizierten Missense-Variante als erstes erfolgen. Bisher fehlte jedoch eine Validierung des nötigen Expressionsniveaus, so dass eine Pathogenitätsbestimmung nicht möglich war.

Die zu untersuchende Variante sollte gemeinsam mit einer Gruppe charakterisierter Varianten und dem MLH1-Wildtyp exprimiert werden, wobei die Variante A681T als Grenzlinie verwendet werden kann (Abbildung 42). Als näher charakterisierte Varianten, abgesehen von A681T, würden sich z.B. L622H, V716M und K618A eignen. Wenn die Variante schlechter exprimiert wird als A681T, gilt sie als pathogen aufgrund der geringen Stabilität. Wenn größere MLH1-Mengen detektiert werden, als bei A681T, gilt die Variante weiterhin als nicht klassifiziert (VUS) und muss weiteren funktionalen Tests unterzogen werden, wie z.B. dem MMR-Assay. Auch wenn die Pathogenitätsentscheidung später im Vergleich zu A681T getroffen wird, wäre es sinnvoll, weitere Varianten gleichzeitig zu exprimieren, um die Expression von A681T zusätzlich zu kontrollieren.

Die Bestimmung der Expression im ersten Schritt hat mehrere Vorteile. Über 40 % der im Screening untersuchten Varianten zeigte eine unzureichende Expression (die Expression war geringer als die von A681T). Für fast 30 % der Varianten wurde eine MLH1-Menge

bestimmt, die signifikant unter der von MLH1 A681T lag (siehe Abschnitt 4.7). So könnte die Bestimmung der Pathogenität einer großen Anzahl von Varianten bereits im ersten Schritt erfolgen. Außerdem ist der Test der Expression von MLH1 in *HEK293T*-Zellen wie unter 3.1.1 beschrieben relativ leicht umzusetzen, im Vergleich zu anderen Methoden kostengünstig und unabhängig von Patientenmaterial, das häufig schwer (im Fall von Blut) oder kaum (im Fall von Tumorgewebe) erhältlich ist. Wenn als Funktionstest der klassische MMR-Assay durchgeführt werden soll, muss die MLH1-Variante zuvor gemeinsam mit PMS2 überexprimiert werden, so dass die Proteinextrakte, in denen die MLH1-Menge bestimmt werden kann, auf jeden Fall angefertigt werden müssen.

Die Empfehlung zum Vorgehen in der Untersuchung der Variante bezieht sich auf die Analyse zur Pathogenitätsbestimmung. Deshalb sollten die wahrscheinlichsten Ursachen für eine Defizienz zuerst untersucht werden. In diesem Fall ist es nicht relevant, ob eine instabile Variante gleichzeitig eine Dimerisierungsdefizienz aufweist, oder einen Interaktionspartner nicht binden kann.

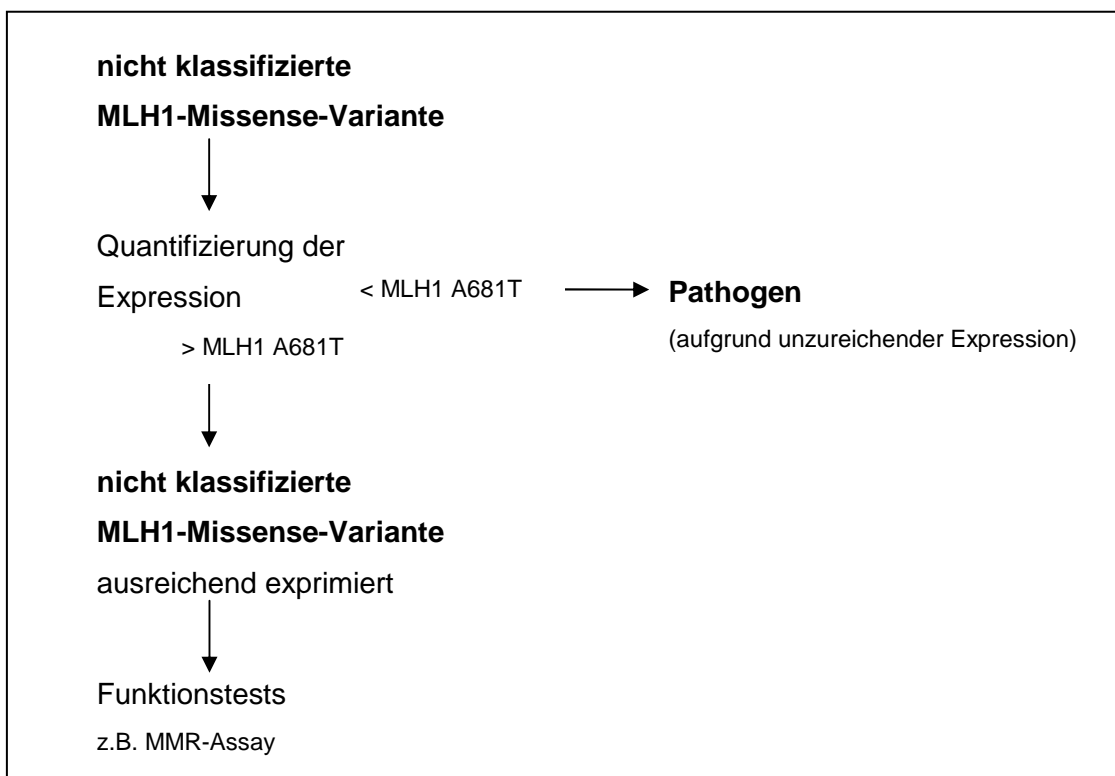


Abbildung 42: Schema zur Klassifizierung von nicht klassifizierten MLH-Missense-Varianten. Zur Untersuchung einer nicht klassifizierten Variante sollte im ersten Schritt die Expression bestimmt werden. Ist die detektierte MLH1-Menge kleiner als bei A681T, gilt die Variante als pathogen. Ist die nachgewiesene MLH1-Menge größer als bei A681T, gilt die Variante weiterhin als nicht klassifiziert und muss in Funktionstests untersucht werden, wie z.B. im MMR-Assay.

## 4.9 AUSBLICK

Die Validierung von experimentellen Ergebnissen mit klinischen Daten ermöglicht eine Beurteilung von weiteren Varianten aufgrund von Tests, auch wenn keine klinischen Daten verfügbar sind. Die Einordnung von Varianten mit reduzierter Proteinstabilität anhand der Variante A681T eignet sich für die Analyse der Pathogenität in anderen Laboren. Hierfür sollte ein standardisiertes Protokoll entwickelt werden, dass die Untersuchung von MLH1-Varianten international anwendbar vereinheitlicht.

Neben der MLH1-Expression müssen auch andere Parameter, die zur Bewertung der Pathogenität von Varianten herangezogen werden, mittels klinischer Daten validiert werden. Das gilt für den MMR-Assay ebenso wie für Dimerisierungsstudien oder die Untersuchung von alternativem Spleißverhalten.

In Zukunft wird die Beurteilung der Pathogenität von Varianten durch experimentelle Daten an Wichtigkeit noch zunehmen, da durch immer schnellere und günstigere DNA-Sequenzierungen mehr Missense-Varianten sowie kleine Deletionen und Insertionen detektiert werden. Zusätzlich werden die Familien zunehmend kleiner und der Generationsabstand immer größer, so dass ausreichende Datenmengen für die Klassifizierung anhand klassischer klinischer Parameter, wie Kosegregationsanalysen, immer seltener vorhanden sein werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Lynch-Syndrom ist eine autosomal dominante Prädisposition für Krebs und verantwortlich für 2 – 5 % der Kolonkarzinome. Es wird durch eine heterozygot vorliegende Keimbahn-Mutation in einem der *Mismatch*-Reparatur-Gene ausgelöst. Die *Mismatch*-Reparatur (MMR) beseitigt Basenfehlpaarungen und Insertions-Deletions-Schleifen, die während der Replikation durch Fehler der Polymerasen entstehen. Wenn das zweite, „gesunde“ Allel des betroffenen *Mismatch*-Reparatur-Genes verloren geht, kommt es zur MMR-Defizienz, die schließlich zur Tumorentstehung führen kann. Die vier Gene *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* und *PMS2* kodieren für die Hauptproteinkomplexe des MMR-Systems. Die meisten Lynch-Syndrom-Mutationen treten in *MLH1* auf und ein Drittel dieser Veränderungen sind Missense-Mutationen.

Die Diagnose Lynch-Syndrom kann nur durch den Nachweis einer inaktivierenden Mutation erfolgen. Bei der Diagnose erhalten Angehörige des Trägers der Mutation die Möglichkeit, an genetischen Tests teilzunehmen und, falls sie Träger der Mutation sind, Zugang zu Vorsorgeprogrammen zu bekommen. Der Einfluss von Missense-Veränderungen auf die Funktionalität des Proteins ist jedoch schwer abschätzbar, so dass diese Varianten als VUS (*variants of uncertain significance*) bezeichnet werden. Das bedeutet, dass bei Trägern dieser Varianten keine Diagnose des Lynch-Syndroms erfolgen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Screening von 58 Missense-Varianten durchgeführt. Im Screening wurden zwei Parameter analysiert, die *MLH1*-Expression und die Reparaturaktivität. Das Screening zeigte, dass viele der Varianten in Expression oder Reparaturfähigkeit eingeschränkt waren. Neben den Varianten, die mit dem Wildtyp-Protein vergleichbare Werte aufwiesen, und Varianten, die weder Reparaturaktivität noch *MLH1*-Expression zeigten, wurden zwei weitere interessante Varianten-Gruppen identifiziert. Zum einen die *loss-of-function* Varianten, für die hohe *MLH1*-Expression aber geringe Reparaturfähigkeit nachgewiesen wurde, zum anderen Varianten, die volle Reparaturaktivität zeigten, jedoch reduzierte *MLH1*-Expression aufwiesen. Aus dem Screening wurden Varianten für die Untersuchung der Dimerisierung von *MLH1* und *PMS2* ausgewählt, sowie Varianten mit unterschiedlich reduzierter *MLH1*-Expression. Diese Varianten wurden verwendet, um die nötige *MLH1*-Menge zu validieren, die eine ausreichende Reparatur gewährleistet und damit zur Apathogenität führt.

Die Dimerisierung von *MLH1* und *PMS2* ist essentiell für die Reparatur. Die Lokalisation der Interaktionsfläche der beiden Proteine wurde vor Beginn der Arbeit kontrovers beschrieben (Cutalo et al. 2006; Guarne et al. 2004; Kosinski et al. 2008). Mit Hilfe von

drei MLH1-Varianten, die PMS2 nicht stabilisieren, wurde gezeigt, dass die Dimerisierungsfläche, wie von Kosinski et al. (2008) vorgeschlagen, von den außenliegenden Subdomänen gebildet wird. Die bioinformatische Analyse der Interaktionsfläche wurde von Dr. Jan Kosinski durchgeführt.

Es wurde gezeigt, dass die verminderte MLH1-Expression vieler Varianten, die im Screening detektiert wurde, nicht auf reduzierte mRNA-Mengen zurückzuführen ist, sondern auf eingeschränkter Proteinstabilität beruht. Die Proteinstabilität wurde mit dem *Pulse-Chase-Assay* und mit dem *Thermal-Shift-Assay* untersucht.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die reduzierte Expression in verminderter Proteinstabilität begründet ist, blieb jedoch die Frage, wie sich die reduzierte Expression in ein Risiko, Tumore zu entwickeln, übersetzt. Deshalb wurden zu den ausgewählten Varianten klinische Daten gesammelt. Es wurden Varianten identifiziert, für die nachgewiesenermaßen ein klinischer Effekt auftritt, und Varianten, bei denen kein Effekt auftritt, die also nicht pathogen sind. Die Aussage der klinischen Daten korrelierte mit den experimentellen Ergebnissen. Die stabileren Varianten sind nicht pathogen, die instabilste Variante verursacht Lynch Syndrom. Diese Varianten definieren die Grenze zwischen pathogen und neutral im Bezug auf die Proteinstabilität.

Abschließend wurde empfohlen, bei der Untersuchung von nichtklassifizierten MLH1-Missense-Varianten zunächst die ausreichende Expression von MLH1 zu untersuchen, die im Vergleich zu den identifizierten „Grenz“-Varianten ermittelt wird.

## 6 SUMMARY

The lynch syndrome is an autosomal-dominant predisposition for cancer and accounts for 2 – 5 % of all colon tumors. It is caused by heterozygous mutations in one of the mismatch repair genes. The mismatch repair (MMR) system removes base mismatches and insertion-deletion-loops occurring during replication due to errors of the polymerase. The loss of the intact allele of the mutated mismatch repair gene leads to MMR-deficiency of the cells, promoting the development of tumors. The four genes *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* and *PMS2* are coding for the main protein components of the MMR-system. Most mutations occur in *MLH1* and approximately one third of them are missense mutations. For the diagnosis of lynch syndrome the verification of an inactivating mutation is required. Only after clear diagnosis of lynch syndrome relatives of the carrier are given the possibility to take part in a genetic test and to join cancer prevention programs if they are carrying the mutation.

The influence of missense mutations on the protein function is hardly assessable. Therefore these variants are referred to as VUS (variants of uncertain significance) and carrier of these mutations cannot be diagnosed as lynch syndrome patients.

In this work, a screening von 58 Variants was performed, including the analysis of *MLH1* expression and repair activity. Most variants showed reduced levels in one of the tested parameters. In addition to variants showing results comparable to the wild type protein and variants with low repair activities and low *MLH1* expression, two other interesting groups of variants were identified. On the one hand the loss-of-function variants, for which high expression levels and low repair activities were detected and, on the other, variants for which high levels of repair activity but reduced expression levels were determined. Variants from the screening were selected to analyze the dimerization of *MLH1* and *PMS2* and to validate the *MLH1* amount required to ensure the repair.

The dimerization of *MLH1* and *PMS2* is essential for the repair reaction. At the start of this work different proposals for the localizations of the dimerization interface were known (Cutalo et al. 2006; Guarne et al. 2004; Kosinski et al. 2008). Three variants which are not stabilizing *PMS2* were identified and it was shown that the dimerization interface is composed by the external domains, as suggested by Kosiński et al. (2008). The bioinformatics analysis of the dimerization interface was carried out by Dr. Jan Kosiński.

It had been shown that the reduced *MLH1* expression of many variants observed in the screening is the result of decreased protein stability and not caused by lower mRNA levels. For the analysis of protein stability the pulse-chase-assay and the thermal shift assay were used: After it had been demonstrated, that the reduced expression levels are caused by decreased protein stability, the question how a reduced expression is

translated into a risk to develop tumors had to be answered. Therefore clinical data were collected for selected variants. Both types of variants with reduced stability were identified: variants which have a clinical effect and variants not showing any effect. The results of the experiments and the clinical data collection correlate. The variants with higher stability are not pathogenic and the most instable of the tested variants is causing lynch syndrome. These variants define the threshold between pathogenic and neutral characteristic with regard to protein stability.

Finally it was proposed to start the analysis of unclassified variants with the tests of the protein expression. The sufficient expression should be determined with the help of the border variants.

---

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aarnio, M., R. Sankila, E. Pukkala, R. Salovaara, L. A. Aaltonen, A. de la Chapelle, P. Peltomaki, J. P. Mecklin, and H. J. Jarvinen. 1999. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International Journal of Cancer* 81 (2): 214-218.
- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A. S. Kondrashov, and S. R. Sunyaev. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 7 (4): 248-249.
- Akiyama, Y., R. Iwanaga, K. Saitoh, K. Shiba, K. Ushio, E. Ikeda, T. Iwama, T. Nomizu, and Y. Yuasa. 1997. Transforming growth factor beta type II receptor gene mutations in adenomas from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 112 (1): 33-39.
- Ban, C., M. Junop, and W. Yang. 1999. Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* 97 (1): 85-97.
- Ban, C., and W. Yang. 1998. Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* 95 (4): 541-552.
- Barnetson, R. A., N. Cartwright, A. van Vliet, N. Haq, K. Drew, S. Farrington, N. Williams, J. Warner, H. Campbell, M. E. Porteous, and M. G. Dunlop. 2008. Classification of ambiguous mutations in DNA mismatch repair genes identified in a population-based study of colorectal cancer. *Human Mutation* 29 (3): 367-374.
- Bellizzi, A. M., and W. L. Frankel. 2009. Colorectal Cancer Due to Deficiency in DNA Mismatch Repair Function A Review. *Advances in Anatomic Pathology* 16 (6): 405-417.
- Belvederesi, L., F. Bianchi, C. Loretelli, D. Gagliardini, E. Galizia, R. Bracci, S. Rosati, I. Bearzi, A. Viel, R. Cellerino, and E. Porfiri. 2006. Assessing the pathogenicity of MLH1 missense mutations in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with clinical, genetic and functional features. *Eur J Hum Genet* 14 (7): 853-859.
- Bianchi, F., E. Galizia, R. Bracci, L. Belvederesi, R. Catalani, C. Loretelli, G. Giorgetti, C. Ferretti, I. Bearzi, E. Porfiri, and R. Cellerino. 2007. Effectiveness of the CRCAPRO program in identifying patients suspected for HNPCC. *Clinical Genetics* 71 (2): 158-164.
- Blasi, M. F., I. Ventura, G. Aquilina, P. Degan, L. Bertario, C. Bassi, P. Radice, and M. Bignami. 2006. A human cell-based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene. *Cancer Research* 66 (18): 9036-9044.
- Boland, C. R., S. N. Thibodeau, S. R. Hamilton, D. Sidransky, J. R. Eshleman, R. W. Burt, S. J. Meltzer, M. A. Rodriguez-Bigas, R. Fodde, G. N. Ranzani, and S. Srivastava. 1998. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58 (22): 5248-5257.
- Borras, E., M. Pineda, I. Blanco, E. M. Jewett, F. Wang, A. Teule, T. Caldes, M. Urioste, C. Martinez-Bouzas, J. Brunet, J. Balmana, A. Torres, T. Ramon y Cajal, J. Sanz, L. Perez-Cabornero, S. Castellvi-Bel, A. Alonso, A. Lanás, S. Gonzalez, V. Moreno, S. B. Gruber, N. A. Rosenberg, B. Mukherjee, C. Lázaro, and G. Capella. 2010. MLH1 founder mutations with moderate penetrance in Spanish Lynch syndrome families. *Cancer Res* 70 (19): 7379-7391.
- Bouvier, M., L. Menard, M. Dennis, and S. Marullo. 1998. Expression and recovery of functional G-protein-coupled receptors using baculovirus expression systems. *Current Opinion in Biotechnology* 9 (5): 522-527.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254.



- Brieger, A., G. Plotz, J. Raedle, N. Weber, W. Baum, W. F. Caspary, S. Zeuzem, and J. Trojan. 2005. Characterization of the nuclear import of human MutL $\alpha$ . *Mol.Carcinog.* 43 (1): 51-58.
- Brunham, L. R., R. R. Singaraja, T. D. Pape, A. Kejariwal, P. D. Thomas, and M. R. Hayden. 2005. Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene. *Plos Genetics* 1 (6): 739-747.
- Cannavo, E., G. Marra, J. Sabates-Bellver, M. Menigatti, S. M. Lipkin, F. Fischer, P. Cejka, and J. Jiricny. 2005. Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Res* 65 (23): 10759-10766.
- Castillejo, Adela, Carla Guarinos, Ana Martinez-Canto, Victor-Manuel Barbera, Cecilia Egoavil, Maria-Isabel Castillejo, Lucia Perez-Carbonell, Ana-Beatriz Sanchez-Heras, Angel Segura, Enrique Ochoa, Rafael Lazaro, Clara Ruiz-Ponte, Luis Bujanda, Montserrat Andreu, Antoni Castells, Angel Carracedo, Xavier Llor, Juan Clofent, Cristina Alenda, Artemio Paya, Rodrigo Jover, and Jose-Luis Soto. 2011. Evidence for classification of c.1852\_1853AA > GC in MLH1 as a neutral variant for Lynch syndrome. *Bmc Medical Genetics* 12.
- Chang, D. K., L. Ricciardiello, A. Goel, C. L. Chang, and C. R. Boland. 2000. Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. *J.Biol.Chem.* 275 (24): 18424-18431.
- Chao, E. C., J. L. Velasquez, M. S. Witherspoon, L. S. Rozek, D. Peel, P. Ng, S. B. Gruber, P. Watson, G. Rennert, H. Anton-Culver, H. Lynch, and S. M. Lipkin. 2008. Accurate classification of MLH1/MSH2 missense variants with multivariate analysis of protein polymorphisms-mismatch repair (MAPP-MMR). *Hum Mutat* 29 (6): 852-860.
- Chen, P. C., S. Dudley, W. Hagen, D. Dizon, L. Paxton, D. Reichow, S. R. Yoon, K. Yang, N. Arnheim, R. M. Liskay, and S. M. Lipkin. 2005. Contributions by MutL homologues Mlh3 and Pms2 to DNA mismatch repair and tumor suppression in the mouse. *Cancer Res* 65 (19): 8662-8670.
- Christensen, L. L., B. E. Madsen, F. P. Wikman, C. Wiuf, K. Koed, A. Tjonneland, A. Olsen, A. C. Syvanen, C. L. Andersen, and T. F. Orntoft. 2008. The association between genetic variants in hMLH1 and hMSH2 and the development of sporadic colorectal cancer in the Danish population. *Bmc Medical Genetics* 9: 13.
- Coolbaugh-Murphy, M. I., J. P. Xu, L. S. Ramagli, B. C. Ramagli, B. W. Brown, P. M. Lynch, S. R. Hamilton, M. L. Frazier, and M. J. Siciliano. 2010. Microsatellite Instability in the Peripheral Blood Leukocytes of HNPCC Patients. *Human Mutation* 31 (3): 317-324.
- Cooper, D. L., R. S. Lahue, and P. Modrich. 1993. Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *J.Biol.Chem.* 268 (16): 11823-11829.
- Corrette-Bennett, S. E., and R. S. Lahue. 1999. Mismatch repair assay. *Methods Mol.Biol.* 113: 121-132.
- Cutalo, J. M., T. A. Darden, T. A. Kunkel, and K. B. Tomer. 2006. Mapping the dimer interface in the C-terminal domains of the yeast MLH1-PMS1 heterodimer. *Biochemistry* 45 (51): 15458-15467.
- De Grassi, A., C. Segala, F. Iannelli, S. Volorio, L. Bertario, P. Radice, L. Bernard, and F. D. Ciccarelli. 2010. Ultradeep Sequencing of a Human Ultraconserved Region Reveals Somatic and Constitutional Genomic Instability. *Plos Biology* 8 (1): 11.
- Desviat, L. R., B. Perez, and M. Ugarte. 2003. Investigation of folding and degradation of in vitro synthesized mutant proteins in the cytosol. *Methods Mol Biol* 232: 257-263.
- Dherin, C., E. Gueneau, M. Francin, M. Nunez, S. Miron, S. E. Liberti, L. J. Rasmussen, S. Zinn-Justin, B. Gilquin, J. B. Charbonnier, and S. Boiteux. 2009. Characterization of a highly conserved binding site of Mlh1 required for exonuclease I-dependent mismatch repair. *Mol Cell Biol* 29 (3): 907-918.
- Dignam, J. D., R. M. Lebovitz, and R. G. Roeder. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11 (5): 1475-1489.

- Dufner, P., G. Marra, M. Raschle, and J. Jiricny. 2000. Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutSalpha is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit. *J.Biol.Chem.* 275 (47): 36550-36555.
- Dutta, R., and M. Inouye. 2000. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem.Sci.* 25 (1): 24-28.
- Duval, A., and R. Hamelin. 2002. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: Toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Research* 62 (9): 2447-2454.
- Dzantiev, L., N. Constantin, J. Genschel, R. R. Iyer, P. M. Burgers, and P. Modrich. 2004. A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Mol.Cell* 15 (1): 31-41.
- Ellison, A. R., J. Lofing, and G. A. Bitter. 2001. Functional analysis of human MLH1 and MSH2 missense variants and hybrid human-yeast MLH1 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* 10 (18): 1889-1900.
- Fan, Y., W. Wang, M. Zhu, J. Zhou, J. Peng, L. Xu, Z. Hua, X. Gao, and Y. Wang. 2007. Analysis of hMLH1 missense mutations in East Asian patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 13 (24): 7515-7521.
- Fang, W. H., and P. Modrich. 1993. Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. *J.Biol.Chem.* 268 (16): 11838-11844.
- Fink, D., S. Aebi, and S. B. Howell. 1998. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clinical Cancer Research* 4 (1): 1-6.
- Flores-Rozas, H., D. Clark, and R. D. Kolodner. 2000. Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex. *Nat.Genet.* 26 (3): 375-378.
- Gargiulo, S., M. Torrini, S. Ollila, S. Nasti, L. Pastorino, R. Cusano, L. Bonelli, L. Battistuzzi, L. Mastracci, W. Bruno, V. Savarino, S. Sciallero, G. Borgonovo, M. Nystrom, G. Bianchi-Scarra, C. Mareni, and P. Ghorzo. 2009. Germline MLH1 and MSH2 mutations in Italian pancreatic cancer patients with suspected Lynch syndrome. *Familial Cancer* 8 (4): 547-553.
- Genschel, J., L. R. Bazemore, and P. Modrich. 2002. Human Exonuclease I is Required for 5' and 3' Mismatch Repair. *J.Biol.Chem.*
- Genschel, J., S. J. Littman, J. T. Drummond, and P. Modrich. 1998. Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J.Biol.Chem.* 273 (31): 19895-19901.
- Genschel, J., and P. Modrich. 2003. Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Mol.Cell* 12 (5): 1077-1086.
- Giraldo, A., A. Gomez, G. Salguero, H. Garcia, F. Aristizabal, O. Gutierrez, L. A. Angel, J. Padron, C. Martinez, H. Martinez, O. Malaver, L. Florez, and R. Barvo. 2005. MLH1 and MSH2 mutations in Colombian families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) - description of four novel mutations. *Familial Cancer* 4 (4): 285-290.
- Goecke, T., K. Schulmann, C. Engel, E. Holinski-Feder, C. Pagenstecher, H. K. Schackert, M. Kloor, E. Kunstmann, H. Vogelsang, G. Keller, W. Dietmaier, E. Mangold, N. Friedrichs, P. Propping, S. Kruger, J. Gebert, W. Schmiegel, J. Rueschoff, M. Loeffler, and G. Moeslein. 2006. Genotype-phenotype comparison of German MLH1 and MSH2 mutation carriers clinically affected with Lynch syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. *J Clin Oncol* 24 (26): 4285-4292.
- Goldgar, D. E., D. E. Easton, G. B. Byrnes, A. B. Spurdle, E. S. Iversen, M. S. Greenblatt, and Iarc Unclassified Genetic Variants. 2008. Genetic Evidence and Integration of Various Data Sources for Classifying Uncertain Variants Into a Single Model. *Human Mutation* 29 (11): 1265-1272.
- Gradia, S., S. Acharya, and R. Fishel. 1997. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* 91 (7): 995-1005.

- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type-5. *Journal of General Virology* 36 (JUL): 59-72.
- Gu, L., Y. Hong, S. McCulloch, H. Watanabe, and G. M. Li. 1998. ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res.* 26 (5): 1173-1178.
- Guarne, A., M. S. Junop, and W. Yang. 2001. Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GH1 ATPase. *EMBO J.* 20 (19): 5521-5531.
- Guarne, A., S. Ramon-Maiques, E. M. Wolff, R. Ghirlando, X. Hu, J. H. Miller, and W. Yang. 2004. Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair. *EMBO J.*
- Guerrette, S., S. Acharya, and R. Fishel. 1999. The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *J.Biol.Chem.* 274 (10): 6336-6341.
- Hall, A. T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* (41): 95-98.
- Hall, M. C., P. V. Shcherbakova, and T. A. Kunkel. 2002. Differential ATP binding and intrinsic ATP hydrolysis by amino-terminal domains of the yeast Mlh1 and Pms1 proteins. *J.Biol.Chem.* 277 (5): 3673-3679.
- Han, H. J., M. Maruyama, S. Baba, J. G. Park, and Y. Nakamura. 1995. Genomic structure of human mismatch repair gene, hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Hum Mol Genet* 4 (2): 237-242.
- Hardt, K., S. B. Heick, B. Betz, T. Goecke, H. Yazdanparast, R. Koppers, K. Servan, V. Steinke, N. Rahner, M. Morak, E. Holinski-Feder, C. Engel, G. Moslein, H. K. Schackert, M. V. Doeberitz, C. Pox, P. Propping, J. H. Hegemann, B. Royer-Pokora, and Hnpcc Consortium German. 2011. Missense variants in hMLH1 identified in patients from the German HNPCC consortium and functional studies. *Familial Cancer* 10 (2): 273-284.
- Henikoff, S., and J. G. Henikoff. 1992. Amino-acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (22): 10915-10919.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand. 1991. Detection of specific polymerase chain-reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of thermus-aquaticus DNA-polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16): 7276-7280.
- Hutter, P., A. Couturier, V. Membrez, F. Joris, A. P. Sappino, and P. O. Chappuis. 1998. Excess of hMLH1 germline mutations in Swiss families with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int.J.Cancer* 78 (6): 680-684.
- Iaccarino, I., G. Marra, P. Dufner, and J. Jiricny. 2000. Mutation in the magnesium binding site of hMSH6 disables the hMutSalphal sliding clamp from translocating along DNA. *J.Biol.Chem.* 275 (3): 2080-2086.
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High-efficiency transformation of escherichia-coli with plasmids. *Gene* 96 (1): 23-28.
- Iyer, R. R., T. J. Pohlhaus, S. Chen, G. L. Hura, L. Dzantiev, L. S. Beese, and P. Modrich. 2008. The MutSalphal-proliferating cell nuclear antigen interaction in human DNA mismatch repair. *J Biol Chem* 283 (19): 13310-13319.
- Jang, E., and D. C. Chung. 2010. Hereditary Colon Cancer: Lynch Syndrome. *Gut and Liver* 4 (2): 151-160.
- Jasperson, K. W., T. M. Tuohy, D. W. Neklason, and R. W. Burt. 2010. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138 (6): 2044-2058.
- Jass, J. R. 1998. Diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Histopathology* 32 (6): 491-497.
- Jass, J. R. 2004. Role of the pathologist in the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Disease Markers* 20 (4-5): 215-224.

- Jiricny, J. 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (5): 335-346.
- Kadyrov, F. A., L. Dzantiev, N. Constantin, and P. Modrich. 2006. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* 126 (2): 297-308.
- Kamory, Eniko, Miklos Tanyi, Orsolya Kolacsek, Judit Olasz, Laszlo Toth, Laszlo Damjanovich, and Orsolya Csuka. 2006. Two germline alterations in mismatch repair genes found in a HNPCC patient with poor family history. *Pathology & Oncology Research* 12 (4): 228-233.
- Kane, M. F., M. Loda, G. M. Gaida, J. Lipman, R. Mishra, H. Goldman, J. M. Jessup, and R. Kolodner. 1997. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Research* 57 (5): 808-811.
- Kim, W. J., B. Rajasekaran, and K. D. Brown. 2007. MLH1- and ATM-dependent MAPK signaling is activated through c-Abl in response to the alkylator N-Methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine. *Journal of Biological Chemistry* 282 (44): 32021-32031.
- Kleczkowska, H. E., G. Marra, T. Lettieri, and J. Jiricny. 2001. hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. *Genes Dev.* 15 (6): 724-736.
- Kloor, M., S. Michel, and M. V. Doeberitz. 2010. Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *International Journal of Cancer* 127 (5): 1001-1010.
- Knudson, A. G., Jr. 1985. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.* 45 (4): 1437-1443.
- Kolas, N. K., A. Svetlanov, M. L. Lenzi, F. P. Macaluso, S. M. Lipkin, R. M. Liskay, J. Greally, W. Edelmann, and P. E. Cohen. 2005. Localization of MMR proteins on meiotic chromosomes in mice indicates distinct functions during prophase I. *Journal of Cell Biology* 171 (3): 447-458.
- Kondo, E., H. Suzuki, A. Horii, and S. Fukushima. 2003. A yeast two-hybrid assay provides a simple way to evaluate the vast majority of hMLH1 germ-line mutations. *Cancer Res* 63 (12): 3302-3308.
- Kosinski, J., M. J. Gajda, I. A. Cymerman, M. A. Kurowski, M. Pawlowski, M. Boniecki, A. Obarska, G. Papaj, P. Sroczynska-Obuchowicz, K. L. Tkaczuk, P. Sniezynska, J. M. Sasin, A. Augustyn, J. M. Bujnicki, and M. Feder. 2005. FRANKENSTEIN becomes a cyborg: the automatic recombination and realignment of fold recognition models in CASP6. *Proteins* 61 Suppl 7: 106-113.
- Kosinski, J., G. Plotz, A. Guarne, J. M. Bujnicki, and P. Friedhoff. 2008. The PMS2 subunit of human MutLalpha contains a metal ion binding domain of the iron-dependent repressor protein family. *J Mol Biol* 382 (3): 610-627.
- Kowalski, L. D., D. G. Mutch, T. J. Herzog, J. S. Rader, and P. J. Goodfellow. 1997. Mutational analysis of MLH1 and MSH2 in 25 prospectively-acquired RER(+) endometrial cancers. *Genes Chromosomes & Cancer* 18 (3): 219-227.
- Kramer, B., W. Kramer, and H. J. Fritz. 1984. Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* 38 (3): 879-887.
- Kunz, C., Y. Saito, and P. Schar. 2009. DNA Repair in Mammalian Cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (6): 1021-1038.
- Kurzawski, G., J. Suchy, M. Lener, E. Klujczo-Grabowska, J. Kladny, K. Safranow, K. Jakubowska, A. Jakubowska, T. Huzarski, T. Byrski, T. Debniak, C. Cybulski, J. Gronwald, O. Oszurek, D. Oszutowska, E. Kowalska, S. Gozdz, S. Niepsuj, R. Slomski, A. Plawski, A. Lacka-Wojciechowska, A. Rozmiarok, L. Fiszer-Maliszewska, M. Bebenek, D. Sorokin, M. M. Sasiadek, A. Stembalska, Z. Grzebieniak, E. Kilar, M. Stawicka, D. Godlewski, P. Richter, I. Brozek, B. Wysocka, J. Limon, A. Jawien, Z. Banaszkiwicz, H. Janiszewska, J. Kowalczyk, D. Czudowska, R. J. Scott, and J. Lubinski. 2006. Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum including large rearrangements in HNPCC families from Poland (update study). *Clinical Genetics* 69 (1): 40-47.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227 (5259): 680-8.
- Lagerstedt Robinson, Kristina, Tao Liu, Jana Vandrovcova, Britta Halvarsson, Mark Clendenning, Thierry Frebourg, Nickolas Papadopoulos, Kenneth W. Kinzler, Bert Vogelstein, Paivi Peltomaki, Richard D. Kolodner, Mef Nilbert, and Annika Lindblom. 2007. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *Journal of the National Cancer Institute* 99 (4): 291-299.
- Lahue, R. S., K. G. Au, and P. Modrich. 1989. DNA mismatch correction in a defined system. *Science* 245 (4914): 160-164.
- Lamers, M. H., A. Perrakis, J. H. Enzlin, H. H. Winterwerp, N. de Wind, and T. K. Sixma. 2000. The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. *Nature* 407 (6805): 711-717.
- Lange, S. S., and K. M. Vasquez. 2009. HMGB1: The Jack-of-All-Trades Protein Is a Master DNA Repair Mechanic. *Molecular Carcinogenesis* 48 (7): 571-580.
- Li, G. M. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18 (1): 85-98.
- Li, G. M., and P. Modrich. 1995. Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (6): 1950-1954.
- Liu, T., P. Tannergard, P. Hackman, C. Rubio, U. Kressner, G. Lindmark, D. Hellgren, B. Lambert, and A. Lindblom. 1999. Missense mutations in hMLH1 associated with colorectal cancer. *Hum Genet* 105 (5): 437-441.
- Longley, M. J., A. J. Pierce, and P. Modrich. 1997. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J.Biol.Chem.* 272 (16): 10917-10921.
- Loughrey, M. B., P. M. Waring, A. Tan, M. Trivett, S. Kovalenko, V. Beshay, M. A. Young, G. McArthur, A. Boussioutas, and A. Dobrovic. 2007. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Familial Cancer* 6 (3): 301-310.
- Lynch, H. T., and A. de la Chapelle. 2003. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348 (10): 919-932.
- Lynch, H. T., P. M. Lynch, S. J. Lanspa, C. L. Snyder, J. F. Lynch, and C. R. Boland. 2009. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics* 76 (1): 1-18.
- Lynch, H. T., M. W. Shaw, C. W. Magnuson, A. L. Larsen, and A. J. Krush. 1966. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch.Intern.Med.* 117 (2): 206-212.
- Lynch, H. T., T. Smyrk, and J. F. Lynch. 1998. Molecular genetics and clinical-pathology features of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome): historical journey from pedigree anecdote to molecular genetic confirmation. *Oncology* 55 (2): 103-108.
- Mac Partlin, M., E. Homer, H. Robinson, C. J. McCormick, D. H. Crouch, S. T. Durant, E. C. Matheson, A. G. Hall, D. A. F. Gillespie, and R. Brown. 2003. Interactions of the DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 with c-MYC and MAX. *Oncogene* 22 (6): 819-825.
- Marcos, I., S. Borrego, M. Urioste, C. Garcia-Valles, and G. Antinolo. 2006. Mutations in the DNA mismatch repair gene MLH1 associated with early-onset colon cancer. *Journal of Pediatrics* 148 (6): 837-839.
- Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Z. Sun, J. Lutterbaugh, R. S. Fan, E. Zborowska, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, M. Brattain, and J. K. V. Willson. 1995. Inactivation of the Type-II TGF-beta Receptor in colon-cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268 (5215): 1336-1338.
- Marnett, L. J., and J. P. Plastaras. 2001. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends in Genetics* 17 (4): 214-221.
- Martinez, S. L., and R. D. Kolodner. 2010. Functional analysis of human mismatch repair gene mutations identifies weak alleles and polymorphisms capable of polygenic

- interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (11): 5070-5075.
- Modrich, P. 1989. Methyl-directed DNA mismatch correction. *J.Biol.Chem.* 264 (12): 6597-6600.
- Modrich, P. 1991. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu.Rev.Genet.* 25: 229-253.
- Modrich, P., and R. Lahue. 1996. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu.Rev.Biochem.* 65: 101-133.
- Mohd, A. B., B. Palama, S. E. Nelson, G. Tomer, M. Nguyen, X. Huo, and A. B. Buermeier. 2006. Truncation of the C-terminus of human MLH1 blocks intracellular stabilization of PMS2 and disrupts DNA mismatch repair. *DNA Repair (Amst)* 5 (3): 347-361.
- Mori, Y., J. Yin, A. Rashid, B. A. Leggett, J. Young, L. Simms, P. M. Kuehl, P. Langenberg, S. J. Meltzer, and O. C. Stine. 2001. Instability typing: Comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Research* 61 (16): 6046-6049.
- Nejda, N., D. Iglesias, M. M. Azcoita, V. M. Arana, J. J. Gonzalez-Aguilera, and A. M. Fernandez-Peralta. 2009. A MLH1 polymorphism that increases cancer risk is associated with better outcome in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 193 (2): 71-77.
- Ng, P. C., and S. Henikoff. 2001. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Research* 11 (5): 863-874.
- Niesen, F. H., H. Berglund, and M. Vedadi. 2007. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* 2 (9): 2212-2221.
- Nooren, I. M., and J. M. Thornton. 2003. Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *J Mol Biol* 325 (5): 991-1018.
- Nystrom-Lahti, M., C. Perrera, M. Raschle, E. Panyushkina-Seiler, G. Marra, A. Curci, B. Quaresima, F. Costanzo, M. D'Urso, S. Venuta, and J. Jiricny. 2002. Functional analysis of MLH1 mutations linked to hereditary nonpolyposis colon cancer. *Genes Chromosomes.Cancer* 33 (2): 160-167.
- Obmolova, G., C. Ban, P. Hsieh, and W. Yang. 2000. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* 407 (6805): 703-710.
- Obrig, T. G., W. J. Culp, W. L. McKeehan, and B. Hardesty. 1971. Mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *Journal of Biological Chemistry* 246 (1): 174-&.
- Pang, Q., T. A. Prolla, and R. M. Liskay. 1997. Functional domains of the *Saccharomyces cerevisiae* Mlh1p and Pms1p DNA mismatch repair proteins and their relevance to human hereditary nonpolyposis colorectal cancer-associated mutations. *Mol Cell Biol* 17 (8): 4465-4473.
- Papadopoulos, N., N. C. Nicolaides, B. Liu, R. Parsons, C. Lengauer, F. Palombo, A. D'Arrigo, S. Markowitz, J. K. Willson, and K. W. Kinzler. 1995. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* 268 (5219): 1915-1917.
- Parsell, D. A., and R. T. Sauer. 1989. The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264 (13): 7590-7595.
- Parthiban, V., M. M. Gromiha, and D. Schomburg. 2006. CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Research* 34: W239-W242.
- Peltomaki, P., and H. Vasen. 2004. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* 20 (4-5): 269-276.
- Peng, M., R. Litman, J. Xie, S. Sharma, R. M. Brosh, Jr., and S. B. Cantor. 2007. The FANCDJ/MutLalpha interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. *Embo J* 26 (13): 3238-3249.

- Perera, S., and B. Bapat. 2008. The MLH1 variants p.Arg265Cys and p.Lys618Ala affect protein stability while p.Leu749Gln affects heterodimer formation. *Hum Mutat* 29 (2): 332.
- Plotz, G., J. Raedle, A. Brieger, J. Trojan, and S. Zeuzem. 2003. N-terminus of hMLH1 confers interaction of hMutLalpha and hMutLbeta with hMutSalpha. *Nucleic Acids Res.* 31 (12): 3217-3226.
- Plotz, G., J. Raedle, A. Spina, C. Welsch, A. Stallmach, S. Zeuzem, and C. Schmidt. 2008. Evaluation of the MLH1 I219V alteration in DNA mismatch repair activity and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 14 (5): 605-611.
- Plotz, G., C. Welsch, L. Giron-Monzon, P. Friedhoff, M. Albrecht, A. Piiper, R. M. Biondi, T. Lengauer, S. Zeuzem, and J. Raedle. 2006a. Mutations in the MutSalpha interaction interface of MLH1 can abolish DNA mismatch repair. *Nucleic Acids Res* 34 (22): 6574-6586.
- Plotz, G., S. Zeuzem, and J. Raedle. 2006b. DNA mismatch repair and Lynch syndrome. *J Mol Histol* 37 (5-7): 271-283.
- Polosina, Y. Y., and C. G. Cupples. 2010. Wot the 'L-Does MutL do? *Mutat Res* 750 (3): 228-248.
- Potapov, V., M. Cohen, and G. Schreiber. 2009. Assessing computational methods for predicting protein stability upon mutation: good on average but not in the details. *Protein Engineering Design & Selection* 22 (9): 553-560.
- Raevaara, T. E., A. M. Gerdes, K. E. Lonqvist, A. Tybjaerg-Hansen, W. M. Abdel-Rahman, R. Kariola, P. Peltomaki, and M. Nystrom-Lahti. 2004. HNPCC mutation MLH1 P648S makes the functional protein unstable, and homozygosity predisposes to mild neurofibromatosis type 1. *Genes Chromosomes & Cancer* 40 (3): 261-265.
- Raevaara, T. E., M. K. Korhonen, H. Lohi, H. Hampel, E. Lynch, K. E. Lonqvist, E. Holinski-Feder, C. Sutter, W. McKinnon, S. Duraisamy, A. M. Gerdes, P. Peltomaki, M. Kohonen-Ccorish, E. Mangold, F. Macrae, M. Greenblatt, A. de la Chapelle, and M. Nystrom. 2005. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology* 129 (2): 537-549.
- Ramensky, V., P. Bork, and S. Sunyaev. 2002. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research* 30 (17): 3894-3900.
- Raschle, M., P. Dufner, G. Marra, and J. Jiricny. 2002. Mutations within the hMLH1 and hPMS2 Subunits of the Human MutLalpha Mismatch Repair Factor Affect Its ATPase Activity, but Not Its Ability to Interact with hMutSalpha. *J.Biol.Chem.* 277 (24): 21810-21820.
- Raschle, M., G. Marra, M. Nystrom-Lahti, P. Schar, and J. Jiricny. 1999. Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J.Biol.Chem.* 274 (45): 32368-32375.
- Rodriguez-Bigas, M. A., C. R. Boland, S. R. Hamilton, D. E. Henson, J. R. Jass, P. M. Khan, H. Lynch, M. Perucho, T. Smyrk, L. Sobin, and S. Srivastava. 1997. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J.Natl.Cancer Inst.* 89 (23): 1758-1762.
- Sacho, E. J., F. A. Kadyrov, P. Modrich, T. A. Kunkel, and D. A. Erie. 2008. Direct visualization of asymmetric adenine-nucleotide-induced conformational changes in MutL alpha. *Mol Cell* 29 (1): 112-121.
- Sanchez de Abajo, Ana, Miguel de la Hoya, Alicia Tosar, Javier Godino, Juan-Manuel Fernandez, Jose-Lopez Asenjo, Beatriz-Perez Villamil, Pedro-Perez Segura, Eduardo Diaz-Rubio, and Trinidad Caldes. 2005. Low prevalence of germline hMSH6 mutations in colorectal cancer families from Spain. *World journal of gastroenterology : WJG* 11 (37): 5770-5776.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5463-5467.

- Santibanez Koref, M., V. Wilson, N. Cartwright, M. S. Cunnington, J. C. Mathers, D. T. Bishop, A. Curtis, M. G. Dunlop, and J. Burn. 2010. MLH1 Differential Allelic Expression in Mutation Carriers and Controls. *Annals of Human Genetics* 74: 479-488.
- Schmiegel, W., A. Reinacher-Schick, D. Arnold, U. Craeven, V. Heinemann, R. Porschen, J. Riemann, C. Rodel, R. Sauer, M. Wieser, W. Schmitt, H. J. Schmoll, T. Seufferlein, I. Kopp, and C. Pox. 2008. Update S3-guideline "Colorectal Cancer" 2008. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie* 46 (8): 799-840.
- Schmutte, C., M. M. Sadoff, K. S. Shim, S. Acharya, and R. Fishel. 2001. The interaction of DNA mismatch repair proteins with human exonuclease I. *J.Biol.Chem.* 276 (35): 33011-33018.
- Shimodaira, H., N. Filosi, H. Shibata, T. Suzuki, P. Radice, R. Kanamaru, S. H. Friend, R. D. Kolodner, and C. Ishioka. 1998. Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet* 19 (4): 384-389.
- Shin, Y. K., S. C. Heo, J. H. Shin, S. H. Hong, J. L. Ku, B. C. Yoo, I. J. Kim, and J. G. Park. 2004. Germline mutations in MLH1, MSH2 and MSH6 in Korean hereditary non-polyposis colorectal cancer families. *Hum Mutat* 24 (4): 351.
- Spampinato, C., and P. Modrich. 2000. The MutL ATPase is required for mismatch repair. *J.Biol.Chem.* 275 (13): 9863-9869.
- Stone, E. A., and A. Sidow. 2005. Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome Research* 15 (7): 978-986.
- Stone, J. G., G. Coleman, B. Gusterson, A. Marossy, S. R. Lakhani, A. Ward, A. Nash, A. McKinna, R. A'Hern, M. R. Stratton, and R. S. Houlston. 2001. Contribution of germline MLH1 and MSH2 mutations to lobular carcinoma in situ of the breast. *Cancer Lett* 167 (2): 171-174.
- Stupart, D. A., P. A. Goldberg, U. Algar, and R. Ramesar. 2009. Surveillance colonoscopy improves survival in a cohort of subjects with a single mismatch repair gene mutation. *Colorectal Disease* 11 (2): 126-130.
- Su, S. S., and P. Modrich. 1986. *Escherichia coli* mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83 (14): 5057-5061.
- Syngal, S., E. A. Fox, C. Eng, R. D. Kolodner, and J. E. Garber. 2000. Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in MSH2 and MLH1. *Journal of Medical Genetics* 37 (9): 641-645.
- Syngal, S., E. A. Fox, C. Li, M. Dovidio, C. Eng, R. D. Kolodner, and J. E. Garber. 1999. Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing. *Jama* 282 (3): 247-253.
- Takahashi, M., H. Shimodaira, C. Andreutti-Zaugg, R. Iggo, R. D. Kolodner, and C. Ishioka. 2007. Functional Analysis of Human MLH1 Variants Using Yeast and In vitro Mismatch Repair Assays. *Cancer Res* 67 (10): 4595-4604.
- Tannergard, P., J. R. Lipford, R. Kolodner, J. E. Frodin, M. Nordenskjold, and A. Lindblom. 1995. Mutation screening in the hMLH1 gene in Swedish hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* 55 (24): 6092-6096.
- Tavtigian, S. V., M. S. Greenblatt, D. E. Goldgar, and P. Boffetta. 2008. Assessing pathogenicity: overview of results from the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. *Hum Mutat* 29 (11): 1261-1264.
- Taylor, C. F., R. S. Charlton, J. Burn, E. Sheridan, and G. R. Taylor. 2003. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat* 22 (6): 428-433.
- Terdiman, Jonathan P., James R. Gum Jr, Peggy G. Conrad, Glenn A. Miller, Vivian Weinberg, Suzanne C. Crawley, Theodore R. Levin, Cynthia Reeves, Anna Schmitt, Michael Hepburn, Marvin H. Sleisenger, and Young S. Kim. 2001. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by



- screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology* 120 (1): 21-30.
- Thomas, P. D., M. J. Campbell, A. Kejariwal, H. Y. Mi, B. Karlak, R. Daverman, K. Diemer, A. Muruganujan, and A. Narechania. 2003. PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Research* 13 (9): 2129-2141.
- Thomas, P. D., and A. Kejariwal. 2004. Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: Evolutionary evidence for differences in molecular effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (43): 15398-15403.
- Tournier, I., G. Raux, F. Di Fiore, I. Marechal, C. Leclerc, C. Martin, Q. Wang, M. P. Buisine, D. Stoppa-Lyonnet, S. Olschwang, T. Frebourg, and M. Tosi. 2004. Analysis of the allele-specific expression of the mismatch repair gene MLH1 using a simple DHPLC-based method. *Human Mutation* 23 (4): 379-384.
- Tournier, I., M. Vezain, A. Martins, F. Charbonnier, S. Baert-Desurmont, S. Olschwang, Q. Wang, M. P. Buisine, J. Soret, J. Tazi, T. Frebourg, and M. Tosi. 2008. A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with splicing defects. *Hum Mutat* 29 (12): 1412-1424.
- Tran, P. T., and R. M. Liskay. 2000. Functional studies on the candidate ATPase domains of *Saccharomyces cerevisiae* MutL $\alpha$ . *Mol. Cell Biol.* 20 (17): 6390-6398.
- Tran, P. T., J. A. Simon, and R. M. Liskay. 2001. Interactions of Exo1p with components of MutL  $\alpha$  in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17): 9760-9765.
- Trojan, J., S. Zeuzem, A. Randolph, C. Hemmerle, A. Brieger, J. Raedle, G. Plotz, J. Jiricny, and G. Marra. 2002. Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology* 122 (1): 211-219.
- Tsai, C. J., S. L. Lin, H. J. Wolfson, and R. Nussinov. 1997. Studies of protein-protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect. *Protein Sci* 6 (1): 53-64.
- Tsurimoto, T. 1999. PCNA binding proteins. *Front Biosci* 4: D849-858.
- Umar, A., C. R. Boland, J. P. Terdiman, S. Syngal, A. de la Chapelle, J. Ruschoff, R. Fishel, N. M. Lindor, L. J. Burgart, R. Hamelin, S. R. Hamilton, R. A. Hiatt, J. Jass, A. Lindblom, H. T. Lynch, P. Peltomaki, S. D. Ramsey, M. A. Rodriguez-Bigas, H. F. Vasen, E. T. Hawk, J. C. Barrett, A. N. Freedman, and S. Srivastava. 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96 (4): 261-268.
- Umar, A., A. B. Buermeier, J. A. Simon, D. C. Thomas, A. B. Clark, R. M. Liskay, and T. A. Kunkel. 1996. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 87 (1): 65-73.
- Umar, A., and T. A. Kunkel. 1996. DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur.J.Biochem.* 238 (2): 297-307.
- Valdar, W. S., and J. M. Thornton. 2001. Protein-protein interfaces: analysis of amino acid conservation in homodimers. *Proteins* 42 (1): 108-124.
- Vasen, H. F. A., P. Watson, J. P. Mecklin, H. T. Lynch, and Hnpcc Icg. 1999. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 116 (6): 1453-1456.
- Vasen, H. F., J. P. Mecklin, P. M. Khan, and H. T. Lynch. 1991. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis.Colon Rectum* 34 (5): 424-425.
- Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, G. J. Tompkins, and P. McCawley. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In vitro* 13 (4): 213-217.
- Vo, A. T., F. X. Zhu, X. L. Wu, F. H. Yuan, Y. Gao, L. Y. Gu, G. M. Li, T. H. Lee, and C. T. Her. 2005. hMRE11 deficiency leads to microsatellite instability and defective DNA mismatch repair. *Embo Reports* 6 (5): 438-444.

- Wang, H. X., and J. B. Hays. 2000. Preparation of DNA substrates for in vitro mismatch repair. *Molecular Biotechnology* 15 (2): 97-104.
- Wang, H. X., and J. B. Hays. 2002. Mismatch repair in human nuclear extracts - Quantitative analyses of excision of nicked circular mismatched DNA substrates, constructed by a new technique employing synthetic oligonucleotides. *Journal of Biological Chemistry* 277 (29): 26136-26142.
- Wang, Q., F. Desseigne, C. Lasset, J. C. Saurin, C. Navarro, T. Yagci, I. Keser, H. Bagci, G. Luleci, T. Gelen, J. A. Chayvialle, A. Puisieux, and M. Ozturk. 1997. Germline hMSH2 and hMLH1 gene mutations in incomplete HNPCC families. *International Journal of Cancer* 73 (6): 831-836.
- Wang, X. L., Y. Yuan, S. Z. Zhang, S. R. Cai, Y. Q. Huang, Q. Jiang, and S. Zheng. 2006. Clinical and genetic characteristics of Chinese hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *World J Gastroenterol* 12 (25): 4074-4077.
- Warthin, A. S. 1913. Heredity with reference to carcinoma. *Arch Intern Med*.
- Wei, K. C., A. B. Clark, E. Wong, M. F. Kane, D. J. Mazur, T. Parris, N. K. Kolas, R. Russell, H. Hou, B. Kneitz, G. Yang, T. A. Kunkel, R. D. Kolodner, P. E. Cohen, and W. Edelmann. 2003. Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes & Development* 17 (5): 603-614.
- Welsh, K. M., A. L. Lu, S. Clark, and P. Modrich. 1987. Isolation and characterization of the Escherichia coli mutH gene product. *J. Biol. Chem.* 262 (32): 15624-15629.
- Wimmer, K., and C. P. Kratz. 2010. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome. *Haematologica-the Hematology Journal* 95 (5): 699-701.
- Wu, X., J. L. Platt, and M. Cascalho. 2003. Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutLalpha. *Mol. Cell Biol.* 23 (9): 3320-3328.
- Young, L., R. L. Jernigan, and D. G. Covell. 1994. A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition. *Protein Sci* 3 (5): 717-729.
- Yuan, F., L. Gu, S. Guo, C. Wang, and G. M. Li. 2004. Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 279 (20): 20935-20940.
- Zhang, Y., F. Yuan, S. R. Presnell, K. Tian, Y. Gao, A. E. Tomkinson, L. Gu, and G. M. Li. 2005. Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell* 122 (5): 693-705.
- Zhao, N., F. Zhu, F. Yuan, A. K. Haick, S. Fukushige, L. Gu, and C. Her. 2008. The interplay between hMLH1 and hMRE11: role in MMR and the effect of hMLH1 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 370 (2): 338-343.

## 8 ANHANG

Tabelle A1: Auflistung der Firmen, deren Produkte verwendet wurden.

Amersham	Braunschweig
AppliChem	Darmstadt
AppliedBiosystems	Warrington, UK
BD Biosciences	Heidelberg
Beckmann Coulter	Krefeld
Biorad	München
C.B.S	Darmstadt
Eurofins (MWG Operon)	Martinsried
Fluka	Bruchs
Fuji	Tokio, Japan
GE-Healthcare	Uppsala, Schweden
Genomed	Löhne
Gibco	Karlsruhe
Greiner	Frickenhausen
Invitrogen	Karlsruhe
Lonza	Verviers, Belgien
Merck	Darmstadt
Millipore	Schwalbach
Minerva Biolabs	Berlin
New England Biolabs	Beverly, USA
PAA	Pasching, Österreich
Polysciences	Eppelheim
Promega	Mannheim
Qiagen	Hilden
Riedel-de-Haën	Seelze
Roche	Mannheim
Roth	Karlsruhe
Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, USA
Sarstedt	Nürnbrecht
Serva	Heidelberg
Sigma-Aldrich	München
Stratagene	La Jolla, USA
Systemc	Wettenberg
usb Corporation	Santa Clara, USA
Zeiss	Jena

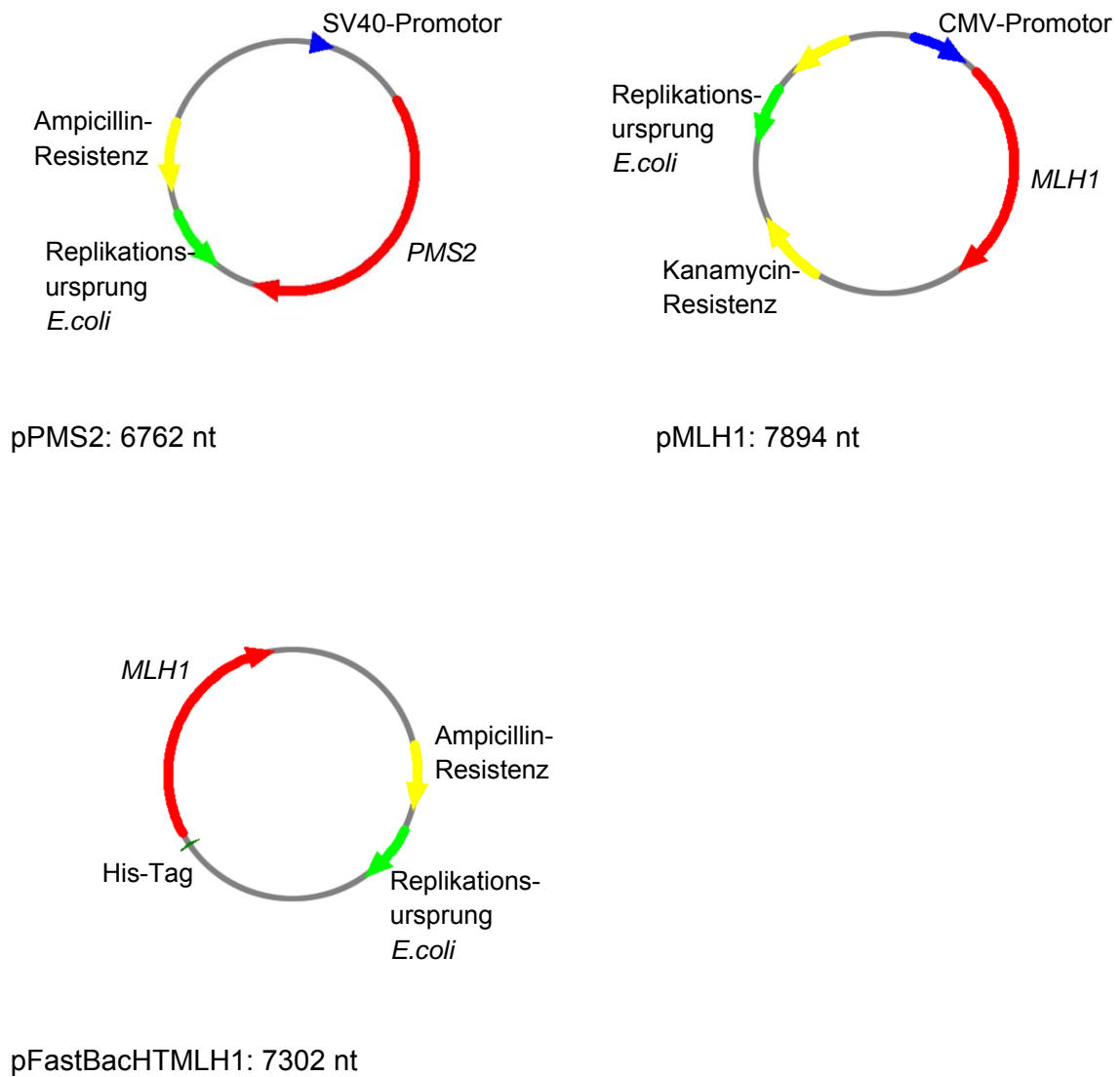


Abbildung A1: Plasmidkarten verwendeter Plasmide. Die Plasmide für die untersuchten MLH1-Varianten basieren auf pMLH1 bzw. auf pFastBacHT-MLH1.







Tabelle A2: Expression der MLH1-Varianten. Auflistung der gemessenen Expressionswerte, der resultierenden Mittelwerte (MW), sowie der Standardabweichung ( $\sigma$ ). Mit dem T-Test wurde berechnet, ob sich die Expression der MLH1 Varianten signifikant von Mittelwert unterscheiden, also der p-Wert kleiner ist als 0,05. Für Varianten mit einer geringeren MLH1-Expression als die Variante A681T, wurde außerdem berechnet, ob die gemessene Expression geringer ist als die von A681T (<A681T). Wenn diese signifikant kleiner war, erfolgte die Kennzeichnung mit \*.

Variante	Expressionswerte																			MW	$\sigma$	n	TTEST		p<0,01	<A681T	
	108	92	93	82	107	91	108	95	103	117	97	105	93	107	100	p-Werte	p<0,05										
wt	108	92	93	82	107	91	108	95	103	117	97	105	93	107	100			15									
I8A	106	164	139	191	129	178	209	248	160	117						164	44	10	0,0012	*	**						
I8E	2	4	0	12	7	6										5	4	6	0	*	**						*0,000
L11A	106	119	119	197	193	252	196	107								161	55	8	0,0163	*							0,139
L11E	18	48	33													33	15	3	0,0117	*							
R18C	147	136	99	131	181	144	95	97	136	135	104					128	27	11	0,0061	*	**						
I19F	166	145	102	98	159	90	128	107	88	87	78	103	107			112	28	13	0,1579								
E23D	116	108	146	95	201	133	144	107	89	112	85					121	33	11	0,0607								
N38H	11	13	21	10												14	5	4	0	*	**						*0,000
D41G	16	21	25	17												20	4	4	0	*	**						*0,000
G54E	24	69	63	53												52	20	4	0,0148	*							0,997
G65D	13	27	3	23												17	11	4	0,0001	*	**						*0,001
T82I	48	47	27													41	12	3	0,0073	*	**						0,231
K84E	62	108	59													76	27	3	0,2748								
G101D	23	20	12	10												16	6	4	0	*	**						*0,000
E102K	5	1	0													2	3	3	0	*	**						*0,000
S106R	184	131	141	195	123	184	151	115	172	127	132	122	95			144	31	13	0,0002	*	**						
H109Q	95	75	53	62												71	18	4	0,0473	*							
T117M	76	41	64	25	26	42	34									44	19	7	0,0001	*	**						0,355
D132H	93	152	82	150												119	37	4	0,3722								
V213M	140	66	164													123	51	3	0,5099								
I219V	107	75	101													94	17	3	0,6335								
R265H	73	96	153	82	50											91	39	5	0,6292								
D304V	152	160	172	91	76	129	121	137	137	101	106	129			126	29	12	0,0097	*	**							
N338S	136	123	87													115	25	3	0,4021								
R385C	41	62	60	77												60	15	4	0,0088	*	**						
R385P	73	67	86	71												74	8	4	0,0027	*	**						



Variante	Expressionswerte										MW	$\sigma$	n	TTEST p-Werte	p<0,05	p<0,01	<A681T
V506A	85	85	37	47	50	46					58	21	6	0,0039	*	**	
R522W	66	54	66								62	7	3	0,0019	*	**	
Q542L	134	113	109	136	82	78	113				109	23	7	0,3242			
N551T	47	48	33	55	47	88					53	18	6	0,001	*	**	
L559R	25	20	38	98							45	36	4	0,0534			0,719
Q562A	49	63	57	56							56	6	4	0	*	**	
L574P	20	28	37	21							27	8	4	0	*	**	*0,001
E578G	60	59	66	72	80	78	81	67	79		71	9	9	0	*	**	
A586P	55	35	54	22	82						50	23	5	0,0066	*	**	0,821
D601G	99	82	76	93	47	98					82	20	6	0,083			
K618A	105	63	60	116	82	66	84	71	67	64	78	19	10	0,0051	*	**	
L622H	93	29	18	24	56	46	25				42	26	7	0,0009	*	**	0,357
P640S	29	13	22	22	54	36	20	44	29		30	13	9	0	*	**	*0,002
P648L	9	24	9	17	54	30	13				22	16	7	0	*	**	*0,002
L653R	3	8	17	14							11	6	4	0	*	**	*0,000
P654L	7	8	33	15	60						25	22	5	0,0012	*	**	*0,048
R659L	45	18	19	25	19	45					28	13	6	0	*	**	*0,005
R659P	6	8	9	20	7	24	11	11	19		13	6	10	0	*	**	*0,000
R659Q	80	52	80	27	29	67	93	59			61	24	8	0,0021	*	**	
T662P	6	35	5	28	4	26	47				22	17	7	0	*	**	*0,002
E663G	89	93	108	75	64	81					85	15	6	0,0636			
V664R	35	38	45	39							39	4	4	0	*	**	*0,018
L676R	33	14	28	20							24	8	4	0	*	**	*0,001
A681T	60	52	37	36	42	50	75	80	48	42	52	14	11	0	*	**	
V716M	59	59	97	58	96	58	61	33	75	48	64	19	14	0	*	**	
H718Y	93	82	58	81	92	88	69	49	49		73	18	9	0,0018	*	**	
R725C	47	21	4	8	50						26	22	5	0,0011	*	**	0,05
L749P	99	83	89	92	89	81	56	94	68	94	85	13	11	0,0052	*	**	
Y750X	124	149	111	117	117	159	98	195	52	140	125	36	11	0,0439	*		
K751R	141	114									128	19	2	0,2817			
R755S	133	100	93	51	147	120	133	95			109	31	8	0,4394			
R755W	46	23	59	88	83	98	103	75			72	27	8	0,0233	*		

Tabelle A3: Zusammenstellung der gemessenen Reparaturaktivitäten. Aus den ermittelten Reparaturaktivitäten wurde der Mittelwert (MW) gebildet und die zugehörige Standardabweichung ( $\sigma$ ) berechnet. Mit dem T-Test wurde berechnet, ob die Reparaturaktivitäten der Varianten sich signifikant von der des Wildtyps unterscheiden.

Variante	Reparaturaktivitäten																MW	$\sigma$	n	TTEST p-Wert	p < 0.05	p < 0.01
	wt	103	89	99	101	97	101	96	104	99	111											
I8A	31	21	38								100	6	10	0,00194	*	**						
I8E	49	26	17	19							28	15	4	0,00151	*							
L11A	35	44	7	30							29	16	4	0,00207	*	**						
L11E	25	28	19								24	5	3	0,00001	*	**						
R18C	99	108	108	90							101	9	4	0,82647								
I19F	29	25	9								21	10	3	0,00318	*	**						
E23D	68	41	55	17	14						39	24	5	0,00393	*							
N38H	16	21	9								15	6	3	0,00015	*	**						
D41G	20	20	0	0							10	12	4	0,00023	*	**						
G54E	38	57	20	60							44	18	4	0,00756	*							
G65D	29	28	8	9							19	12	4	0,00033	*	**						
T82I	10	13	0	0							6	7	4	0	*	**						
K84E	0	19	7								9	10	3	0,00164	*	**						
G101D	10	11	13								11	1	3	0	*	**						
E102K	11	54	32	13							27	20	4	0,00465	*	**						
S106R	19	29	38	23							27	8	4	0,00006	*	**						
H109Q	69	99	45								71	27	3	0,20488								
V117M	18	0	0	0							5	9	4	0,00004	*	**						
D132H	96	105	108	102							103	5	4	0,4134								
V213M	96	101	109	100	102						102	5	5	0,5785								
I219V	100	105	107	78	97						97	12	5	0,65469								
R265H	99	93	88	79	95						91	8	5	0,0538		**						
D304V	65	37	40	15							39	20	4	0,00827	*							
N338S	92	69									81	17	2	0,34103								
R385C	41	47									44	4	2	0,00534	*							
R385P	24	17									21	5	2	0,00652	*	**						

Variante	Reparaturaktivitäten																MW	$\sigma$	n	TTEST p-Werte	p<0,05	p<0,01
	87	95	97	74	91	97	78	87	80	92	87	80	92	8	14	10						
V506A	87	95	97	74	91	97	78						88	9	7	0,01682	*					
R522W	110	112	103	105	96								105	6	5	0,16207						
Q542L	66	58	39	39	20	32	18						39	18	7	0,00006	*	**				
N551T	93	103	65	80	58								80	19	5	0,07254						
L559R	84	93	76	82	61								79	12	5	0,01434	*					
Q562A	92	91	96	74	66								84	13	5	0,04725	*					
L574P	0	0	47	44	5	0							16	23	6	0,00022	*	**				
E578G	99	82	78	84	102	102							91	11	6	0,11301						
A586P	0	0	55	51	13	6							21	25	6	0,00049	*	**				
D601G	98	99	97	88	97								96	5	5	0,14968						
K618A	102	95	91	92	81	93	88						92	6	7	0,01889	*					
L622H	76	72	88	83									80	7	4	0,00507	*	**				
P640S	77	75	84	85	63	92	87	80					80	9	8	0,00019	*	**				
P648L	98	87											92	8	2	0,38799						
L653R	10	0	0	9									5	5	4	0	*	**				
P654L	61	74	84	50									67	15	4	0,0191	*					
R659L	84	76	106	93	66								85	15	5	0,09331						
R659P	0	0	0	21	18	0	0	0	40				8	14	10	0	*	**				
R659Q	93	105	106	87	97	106							99	8	6	0,78511						
T662P	89	93	101	88									93	6	4	0,09066						
E663G	95	101	89										95	6	3	0,28767						
V664R	96	94	99										96	3	3	0,15102						
L676R	0	34	0	14									12	16	4	0,00112	*	**				
A681T	93	90	98	100	112								99	8	5	0,74554						
V716M	89	93	104	65									88	16	4	0,23369						
H718Y	105	115	104	98	128								110	12	5	0,12814						
R725C	94	119	91	100									101	13	4	0,8902						
L749P	0	0	28	16	33								15	15	5	0,00013	*	**				
Y750X	0	0	15	13	24								10	10	5	0,00001	*	**				
K751R	97	91	85										91	6	3	0,11128		**				
R755S	0	11	29	12									13	12	4	0,00034	*	**				
R755W	0	12	0	16	21								10	9	5	0	*	**				

Tabelle A4: Expression von PMS2 mit verschiedenen MLH1-Varianten. Auflistung der gemessenen PMS2-Expressionswerte, der resultierenden Mittelwerte (MW), sowie der Standardabweichung ( $\sigma$ ). Mit dem T-Test wurde berechnet, ob sich die PMS2-Menge, die mit den MLH1-Varianten gemessen wurde, signifikant von der, die für PMS2 detektiert wurde, wenn es gemeinsam mit MLH1-Wildtyps exprimiert wurde, unterscheidet. PMS2 allein – hier wurde PMS2 ohne MLH1 exprimiert.

Variante	PMS2-Expression																MW	$\sigma$	T-TEST p-Werte	<0,05	<0,01
	78	97	103	108	83	111	87	102	85	87	112	109									
wt	78	97	103	108	83	111	87	102	85	87	112	109	97	12							
PMS2 allein	44	35	34	54	25	43	25						37	11	0	*	**				
Q542L	52	78	63	59	24								55	20	0,00636	*	**				
N551T	78	55	46										60	17	0,04524	*					
L559R	43	44											44	1	0	*	**				
A586P	66	13											40	37	0,27091						
D601G	107	90	70										89	19	0,5467						
K618A	105	71	113	64									88	24	0,54023						
L622H	94	23	57	27									50	33	0,06284						
S640P	101	30	62	28									55	34	0,09088						
P648L	39	73	64	54	38								54	15	0,0012	*	**				
P654L	36	68	15										40	27	0,05888						
R659L	78	78	50										69	16	0,07845						
R659P	30	41	6										26	18	0,01271	*	**				
R659Q	88	68	112	92									90	18	0,51973						
T662P	38	81	34										51	26	0,08565						
E663G	105	153	89										116	33	0,43142						
L749P	34	46	39	36	63	30	36						41	11	0	*	**				
Y750X	33	37	59	62	57	58	36						49	13	0	*	**				
R755S	143	121	106	113									121	16	0,04945	*					
R755W	102	48	89	99									85	25	0,4027						

Tabelle A5: Fälle deren Daten in die Auswertung der klinischen Daten eingingen (Tabelle 8), sowie die zugehörigen Referenzen.

**T117M**

Fall	Referenz	
1	Gille 2002	[1]
2	Deiumegard 2000	[2]
3	Lee 2005	[3]
4	Yap 2009	[4]
5	Raedle 2001	[5]
6-7	Plevova 2004	[6]
8	Yuen 2002, Chan 1999	[7, 8]
9	Liu 1996	[9]
10	Maliaka 1996	[10]
11-12	Ward 2002	[11]
13-15	Zavodna 2006	[12]
16-21	Bennett 1998	[13]
22	Wang 1999	[14]
23	Jakubowska 2001	[15]
24	Caluseriu 2001	[16]
25-26	Bisgaard 2002	[17]
27	Kurzawski JMG 2002	[18]
28	Wei 2003	[19]
29	Kurzawski 2001	[20]
30	Naseem 2006	[21]
31	Alemayehu 2008	[22]
32	Lastella 2011	[23]
33-34	Hardt 2011	[24]
35-38	Nilbert 2009	[25]

**E578G**

Fall	Referenz	
	Tannergard 1995; Liu, Lindblom 2000;	[26-29]
1-2	Salashor 2001; Liu 1999	
3-4	Liu 1999; Lagerstedt-Robinson 2007	[29, 30]
5	Chadwick 2001	[31]
6	Wagner 2003	[32]
7	Smolarz 2004	[33]
8-10	Nilbert 2009	[25]
11	Chao 2008	[34]

**K618A**

Fall	Referenz	
1-2	Wolf 2005	[35]
3-9	Raevaara 2005	[36]
10	Tannergard 1995, Liu 1999, Wahlberg 1999	[26, 29, 37]
11	Salashor 2001	[28]
12	Ward 2002	[11]
13	Syngal 1999	[38]

14-17	Liu 1999	[29]
18	Samowitz 2001	[39]
19-20	Blasi 2006	[40]
21	Farrington 1998	[41]
22-23	Mauillon 1996	[42]
24	Levene 2003	[43]
25	Pinol 2005	[44]
26	Scartozzi 2002, Belvederesi 2006	[45, 46]
27	Weber 1997, Peltomäki 1997	[47, 48]
28	Wijnen 1997	[49]
29-30	Steinke 2008	[50]
31-32	Gille 2002	[1]
33-35	Caldes 2004	[51]
36-37	Caldes 2002, Caldes 2004	[51, 52]
38-53	Barnetson 2008	[53]
54	Fidalgo 2000	[54]
55	Müller-Koch 2001	[55]
56	Hudler 2004	[56]
57-60	Fearnhead 2004	[57]
61	Scott 2001	[58]
62-63	Hampel 2006	[59]
64	Bianchi 2007	[60]
65	Papp 2007	[61]
66	Christensen 2008	[62]
67-73	Nilbert 2009	[25]
74-75	Rubio-del-Campo 2008	[63]
76	Sharp 2004	[64]
77	Gargiulo 2009	[65]
78	Nejda 2009	[66]
79	Martinez-Bousatz 2009	[67]
80-82	Sanchez de Abajo 2005	[68]
83	Loader 2002 und 2005	[69, 70]
84	Betz 2010	[71]
85	Perera 2010	[72]
86	Kurzawski 2006	[73]
87-105	Castilleio 2011	[74]
106-123	Hardt 2011	[24]

**L622H**

Fall	Referenz	
1-20	Borras 2010	[75]
21-23	Caldes 2002/2004	[51, 52]

**P654L**

Fall	Referenz	
1-4	Raevaara 2005	[36]
5-20	Hardt 2011	[24]

**R659P**

Fall	Referenz	
1	Gylling 2007	[76]
2	Raevaara 2005	[36]
3-4	Kuismanen 2000	[77]
5	Raedle 2001	[5]

**A681T**

Fall	Referenz	
1	Raevaara 2005	[36]
2	Giraldo 2005, Gomez 2005	[78, 79]
3	Becouarn 2005	[80]
4-8	Frogatt 1996	[81]
9-10	Barnetson 2006	[82]
11-21	Barnetson 2008	[53]
22-23	Jakubowska 2001	[15]
24-29	Kurzawski 2002	[18]
30	Kurzawski 2001	[20]
31	Sheng 2006	[83]
32-33	Pedroni 2007	[84]
34-43	Hardt 2011	[24]

**V716M**

Fall	Referenz	
1	Barnetson 2008	[53]
2	Wolf 2005	[35]
3	Martinez-Bousaz 2009	[67]
4-5	Müller-Koch 2001	[55]
6-7	Caldes 2004	[51]
8	Hutter 1998	[85]
9	Dieumgard 2000	[2]
10	Ward 2002	[11]
11	Cunningham 2001	[86]
12-13	Genuardi 1999	[87]
14	Syngal 1999	[38]
15-18	Raevaara 2005	[36]
19	Marcos 2006	[88]
20-21	Kamory 2006	[89]
22	Wijnen 1998	[90]
23	Kowalski 1997	[91]
24	Hegde 2005	[92]
25	Gylling 2008	[93]
26	RubioDelCampo 2008	[63]
27	Mao 2008	[94]
28	Lagerstedt-Robinson 2007	[30]
29	Hampel 2006	[59]
30	Auclair 2006	[95]
31	Capozzi 1999	[96]
32	Kurzawski 2006	[73]

33	Casey 2005	[97]
34-52	Hardt 2011	[24]
53-54	Limburg 2011	[98]

**H718Y**

Fall	Referenz	
1-2	Loader 2005 und 2002	[69, 70]
3	Dieumegard 2000	[2]
4-6	Kowalski 1997	[91]
7	Terdiman 2001	[99]
8-10	Weber 1999	[100]
11	Christensen 2002	[101]
12	Barnetson 2008	[53]
13-14	Rossi 2002	[102]
15	Otway 2000	[103]
16	Gurin 1999	[104]
17-19	Moussa 2011	[105]
20	Hardt 2011	[24]

**L749P**

Fall	Referenz	
1	Colombino 2003	[106]
2	Perera 2010	[72]
3-4	Losi 2005	[107]
5	Pedroni 2007	[84]
6-8	Duraturro 2006	[108]

1. Gille, J.J.P., et al., Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *British Journal of Cancer*, 2002. 87(8): p. 892-897.
2. Dieumegard, B., et al., Extensive molecular screening for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 2000. 82(4): p. 871-880.
3. Lee, S.C., et al., Clinical and molecular characteristics of hereditary non-polyposis colorectal cancer families in Southeast Asia. *Clinical Genetics*, 2005. 68(2): p. 137-145.
4. Yap, H.L., et al., Recurring MLH1 deleterious mutations in unrelated Chinese Lynch syndrome families in Singapore. *Familial Cancer*, 2009. 8(2): p. 85-94.
5. Raedle, J., et al., Bethesda guidelines: relation to microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in patients with colorectal cancer. *Ann.Intern.Med.*, 2001. 135(8 Pt 1): p. 566-576.
6. Plevova, P., et al., Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary non-polyposis colon cancer and sporadic colon cancer. *Neoplasma*, 2004. 51(4): p. 275-284.
7. Yuen, S.T., et al., Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene*, 2002. 21(49): p. 7585-7592.
8. Chan, T.L., et al., Frequent microsatellite instability and mismatch repair gene mutations in young Chinese patients with colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1999. 91(14): p. 1221-1226.



9. Liu, B., et al., Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat.Med.*, 1996. 2(2): p. 169-174.
10. Maliaka, Y.K., et al., CpG dinucleotides in the hMSH2 and hMLH1 genes are hotspots for HNPCC mutations. *Human Genetics*, 1996. 97(2): p. 251-255.
11. Ward, R., et al., Impact of microsatellite testing and mismatch repair protein expression on the clinical interpretation of genetic testing in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2002. 128(8): p. 403-411.
12. Zavodna, K., et al., Novel and recurrent germline alterations in the MLH1 and MSH2 genes identified in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients in Slovakia. *Neoplasma*, 2006. 53(4): p. 269-276.
13. Bennett, G., et al., The impact of molecular diagnosis on familial colorectal cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1998. 36(8): p. 641-644.
14. Wang, Q., et al., Prevalence of germline mutations of hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, and hMSH6 genes in 75 French kindreds with nonpolyposis colorectal cancer. *Hum Genet*, 1999. 105(1-2): p. 79-85.
15. Jakubowska, A., et al., Optimization of experimental conditions for RNA-based sequencing of MLH1 and MSH2 genes. *Human Mutation*, 2001. 17(1): p. 52-60.
16. Caluseriu, O., et al., Four novel MSH2 and MLH1 frameshift mutations and occurrence of a breast cancer phenocopy in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Human Mutation*, 2001. 17(6): p. 521.
17. Bisgaard, M.L., et al., Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC): Phenotype-genotype correlation between patients with and without identified mutation. *Human Mutation*, 2002. 20(1): p. 20-27.
18. Kurzawski, G., et al., Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum in HNPCC families from Poland and the Baltic States. *Journal of Medical Genetics*, 2002. 39(10): p. E65.
19. Wei, S.C., et al., Low mutation rate of hMSH2 and hMLH1 in Taiwanese hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Clinical Genetics*, 2003. 64(3): p. 243-251.
20. Kurzawski, G., et al., Age at diagnosis of cancer as predictor of mutation occurrence in families suspected of HNPCC. *Journal of applied genetics*, 2001. 42(3): p. 359-66.
21. Naseem, H., et al., Inherited association of breast and colorectal cancer: limited role of CHEK2 compared with high-penetrance genes. *Clinical Genetics*, 2006. 70(5): p. 388-395.
22. Alemayehu, A., K. Sebova, and I. Fridrichova, Redundant DNA methylation in colorectal cancers of Lynch-syndrome patients. *Genes Chromosomes & Cancer*, 2008. 47(10): p. 906-914.
23. Lastella, P., et al., Identification and surveillance of 19 Lynch syndrome families in southern Italy: report of six novel germline mutations and a common founder mutation. *Familial Cancer*. 10(2): p. 285-295.
24. Hardt, K., et al., Missense variants in hMLH1 identified in patients from the German HNPCC consortium and functional studies. *Familial Cancer*, 2011. 10(2): p. 273-284.
25. Nilbert, M., et al., Major contribution from recurrent alterations and MSH6 mutations in the Danish Lynch syndrome population. *Familial Cancer*, 2009. 8(1): p. 75-83.
26. Tannergard, P., et al., Mutation screening in the hMLH1 gene in Swedish hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res*, 1995. 55(24): p. 6092-6.
27. Liu, T., et al., Microsatellite instability as a predictor of a mutation in a DNA mismatch repair gene in familial colorectal cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*, 2000. 27(1): p. 17-25.
28. Salahshor, S., et al., Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Laboratory Investigation*, 2001. 81(4): p. 535-541.

29. Liu, T., et al., Missense mutations in hMLH1 associated with colorectal cancer. *Hum Genet*, 1999. 105(5): p. 437-41.
30. Lagerstedt Robinson, K., et al., Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *Journal of the National Cancer Institute*, 2007. 99(4): p. 291-9.
31. Chadwick, R.B., et al., Hereditary and somatic DNA mismatch repair gene mutations in sporadic endometrial carcinoma. *Journal of Medical Genetics*, 2001. 38(7): p. 461-466.
32. Wagner, A., et al., Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: High mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene. *American Journal of Human Genetics*, 2003. 72(5): p. 1088-1100.
33. Smolarz, B., et al., Genetics analysis of microsatellite markers in patients from hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) family. *Experimental Oncology*, 2004. 26(3): p. 205-209.
34. Chao, E.C., et al., Accurate classification of MLH1/MSH2 missense variants with multivariate analysis of protein polymorphisms-mismatch repair (MAPP-MMR). *Hum Mutat*, 2008. 29(6): p. 852-60.
35. Wolf, B., et al., Spectrum of germ-line MLH1 and MSH2 mutations in Austrian patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 2005. 117(7-8): p. 269-277.
36. Rævaara, T.E., et al., Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology*, 2005. 129(2): p. 537-49.
37. Wahlberg, S., et al., Various mutation screening techniques in the DNA mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1. *Genetic Testing*, 1999. 3(3): p. 259-264.
38. Syngal, S., et al., Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing. *Jama*, 1999. 282(3): p. 247-53.
39. Samowitz, W.S., et al., The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology*, 2001. 121(4): p. 830-838.
40. Blasi, M.F., et al., A human cell-based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene. *Cancer Research*, 2006. 66(18): p. 9036-9044.
41. Farrington, S.M., et al., Systematic analysis of hMSH2 and hMLH1 in young colon cancer patients and controls. *American Journal of Human Genetics*, 1998. 63(3): p. 749-759.
42. Mauillon, J., et al., Identification of novel germline hMLH1 mutations including a 22 KB Alu-mediated deletion in patients with familial colorectal cancer. *Gastroenterology*, 1997. 112(4): p. A611-A611.
43. Levene, S., et al., Does the occurrence of certain rare cancers indicate an inherited cancer susceptibility? *Familial Cancer*, 2003. 2(1): p. 15-25.
44. Pinol, V., et al., Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2005. 293(16): p. 1986-1994.
45. Scartozzi, M., et al., Mutations of hMLH1 and hMSH2 in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Correlation with microsatellite instability and abnormalities of mismatch repair protein expression. *Journal of Clinical Oncology*, 2002. 20(5): p. 1203-1208.
46. Belvederesi, L., et al., Assessing the pathogenicity of MLH1 missense mutations in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with clinical, genetic and functional features. *Eur J Hum Genet*, 2006. 14(7): p. 853-9.
47. Weber, T.K., et al., Genomic DNA-based hMSH2 and hMLH1 mutation screening in 32 Eastern United States hereditary nonpolyposis colorectal cancer pedigrees. *Cancer Research*, 1997. 57(17): p. 3798-3803.

48. Peltomaki, P. and H.F. Vasen, Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 1997. 113(4): p. 1146-58.
49. Wijnen, J., et al., Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. *American Journal of Human Genetics*, 1997. 61(2): p. 329-335.
50. Steinke, V., et al., No association between MUTYH and MSH6 germline mutations in 64 HNPCC patients. *European Journal of Human Genetics*, 2008. 16(5): p. 587-592.
51. Caldes, T., et al., Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Oncology Reports*, 2004. 12(3): p. 621-629.
52. Caldes, T., et al., Prevalence of germline mutations of MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from Spain. *International Journal of Cancer*, 2002. 98(5): p. 774-779.
53. Barnetson, R.A., et al., Classification of ambiguous mutations in DNA mismatch repair genes identified in a population-based study of colorectal cancer. *Human Mutation*, 2008. 29(3): p. 367-374.
54. Fidalgo, P., et al., Detection of mutations in mismatch repair genes in Portuguese families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) by a multi-method approach. *European Journal of Human Genetics*, 2000. 8(1): p. 49-53.
55. Muller-Koch, Y., et al., Sixteen rare sequence variants of the hMLH1 and hMSH2 genes found in a cohort of 254 suspected HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer) patients: Mutations or polymorphisms? *European Journal of Medical Research*, 2001. 6(11): p. 473-482.
56. Hudler, P., et al., Mutations in the hMLH1 gene in Slovenian patients with gastric carcinoma (vol 65, pg 405, 2004). *Clinical Genetics*, 2004. 66(1): p. 81-81.
57. Fearnhead, N.S., et al., Multiple rare variants in different genes account for multifactorial inherited susceptibility to colorectal adenomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(45): p. 15992-15997.
58. Scott, R.J., et al., Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families: differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds. *Am J Hum Genet*, 2001. 68(1): p. 118-127.
59. Hampel, H., et al., Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Research*, 2006. 66(15): p. 7810-7817.
60. Bianchi, F., et al., Effectiveness of the CRCAPRO program in identifying patients suspected for HNPCC. *Clinical Genetics*, 2007. 71(2): p. 158-164.
61. Papp, J., M.E. Kovacs, and E. Olah, Germline MLH1 and MSH2 mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis colorectal cancer families: Implications for genetic testing. *World Journal of Gastroenterology*, 2007. 13(19): p. 2727-2732.
62. Christensen, L.L., et al., The association between genetic variants in hMLH1 and hMSH2 and the development of sporadic colorectal cancer in the Danish population. *Bmc Medical Genetics*, 2008. 9: p. 13.
63. Rubio-Del-Campo, A., et al., Implications of mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 in patients with sporadic renal cell carcinoma. *Bju International*, 2008. 102(4): p. 504-509.
64. Sharp, A., et al., RNA analysis reveals splicing mutations and loss of expression defects in MLH1 and BRCA1. *Human Mutation*, 2004. 24(3): p. 272.
65. Gargiulo, S., et al., Germline MLH1 and MSH2 mutations in Italian pancreatic cancer patients with suspected Lynch syndrome. *Familial Cancer*, 2009. 8(4): p. 547-553.

66. Nejda, N., et al., A MLH1 polymorphism that increases cancer risk is associated with better outcome in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2009. 193(2): p. 71-77.
67. Martinez-Bouzas, C., et al., A study on MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from the Basque Country, describing four new germline mutations. *Familial Cancer*, 2009. 8(4): p. 533-539.
68. Sanchez de Abajo, A., et al., Low prevalence of germline hMSH6 mutations in colorectal cancer families from Spain. *World journal of gastroenterology : WJG*, 2005. 11(37): p. 5770-6.
69. Loader, S., et al., Patient vs. physician as the target of educational outreach about screening for an inherited susceptibility to colorectal cancer. *Genetic Testing*, 2002. 6(4): p. 281-290.
70. Loader, S., C. Shields, and P.T. Rowley, Impact of genetic counseling and DNA testing on individuals with colorectal cancer with a positive family history: A population-based study. *Genetic Testing*, 2005. 9(4): p. 313-319.
71. Betz, B., et al., Comparative in silico analyses and experimental validation of novel splice site and missense mutations in the genes MLH1 and MSH2. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2010. 136(1): p. 123-134.
72. Perera, S., et al., A Novel and Rapid Method of Determining the Effect of Unclassified MLH1 Genetic Variants on Differential Allelic Expression. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2010. 12(6): p. 757-764.
73. Kurzawski, G., et al., Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum including large rearrangements in HNPCC families from Poland (update study). *Clinical Genetics*, 2006. 69(1): p. 40-47.
74. Castillejo, A., et al., Evidence for classification of c.1852\_1853AA > GC in MLH1 as a neutral variant for Lynch syndrome. *Bmc Medical Genetics*, 2011. 12.
75. Borrás, E., et al., MLH1 founder mutations with moderate penetrance in Spanish Lynch syndrome families. *Cancer Res*, 2010. 70(19): p. 7379-91.
76. Gylling, A., et al., Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut*, 2007. 56(7): p. 926-933.
77. Kuismanen, S.A., et al., Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *American Journal of Pathology*, 2000. 156(5): p. 1773-1779.
78. Giraldo, A., et al., MLH1 and MSH2 mutations in Colombian families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) - description of four novel mutations. *Familial Cancer*, 2005. 4(4): p. 285-290.
79. Gomez, A., et al., [Detection mutations in the DNA mismatch repair genes of hMLH1 and hMSH2 genes in Colombian families with suspicion of hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome)]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 2005. 25(3): p. 315-24.
80. Becouarn, Y., et al., Value of microsatellite instability typing in detecting hereditary non-polyposis colorectal cancer - A prospective multicentric study by the Association Aquitaine Gastro. *Gastroenterologie Clinique Et Biologique*, 2005. 29(6-7): p. 667-675.
81. Froggatt, N.J., et al., Mutation screening of MSH2 and MLH1 mRNA in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 1996. 33(9): p. 726-730.
82. Barnetson, R.A., et al., Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 2006. 354(26): p. 2751-2763.
83. Sheng, J.Q., et al., Microsatellite instability and novel mismatch repair gene mutations in northern Chinese population with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Chinese journal of digestive diseases*, 2006. 7(4): p. 197-205.
84. Pedroni, M., et al., A mononucleotide markers panel to identify hMLH1/hMSH2 germline mutations. *Disease Markers*, 2007. 23(3): p. 179-187.

85. Hutter, P., et al., Excess of hMLH1 germline mutations in Swiss families with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int.J.Cancer*, 1998. 78(6): p. 680-684.
86. Cunningham, J.M., et al., The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *American Journal of Human Genetics*, 2001. 69(4): p. 780-790.
87. Genuardi, M., et al., Assessment of pathogenicity criteria for constitutional missense mutations of the hereditary nonpolyposis colorectal cancer genes MLH1 and MSH2. *European Journal of Human Genetics*, 1999. 7(7): p. 778-782.
88. Marcos, I., et al., Mutations in the DNA mismatch repair gene MLH1 associated with early-onset colon cancer. *Journal of Pediatrics*, 2006. 148(6): p. 837-839.
89. Kamory, E., et al., Two germline alterations in mismatch repair genes found in a HNPCC patient with poor family history. *Pathology & Oncology Research*, 2006. 12(4): p. 228-233.
90. Wijnen, J., et al., MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet*, 1998. 20(4): p. 326-8.
91. Kowalski, L.D., et al., Mutational analysis of MLH1 and MSH2 in 25 prospectively-acquired RER(+) endometrial cancers. *Genes Chromosomes & Cancer*, 1997. 18(3): p. 219-227.
92. Hegde, M., et al., Assay validation for identification of hereditary nonpolyposis colon cancer-causing mutations in mismatch repair genes MLH1, MSH2, and MSH6. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2005. 7(4): p. 525-534.
93. Gylling, A.H.S., et al., Differential cancer predisposition in Lynch syndrome: insights from molecular analysis of brain and urinary tract tumors. *Carcinogenesis*, 2008. 29(7): p. 1351-1359.
94. Mao, G., et al., Preferential loss of mismatch repair function in refractory and relapsed acute myeloid leukemia: potential contribution to AML progression. *Cell Research*, 2008. 18(2): p. 281-289.
95. Auclair, J., et al., Systematic mRNA analysis for the effect of MLH1 and MSH2 missense and silent mutations on aberrant splicing. *Hum Mutat*, 2006. 27(2): p. 145-54.
96. Capozzi, E., et al., Evaluation of the replication error phenotype in relation to molecular and clinicopathological features in hereditary and early onset colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 1999. 35(2): p. 289-295.
97. Casey, G., et al., Conversion analysis for mutation detection in MLH1 and MSH2 in patients with colorectal cancer. *Jama*, 2005. 293(7): p. 799-809.
98. Limburg, P.J., et al., Prevalence of Alterations in DNA Mismatch Repair Genes in Patients With Young-Onset Colorectal Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2011. 9(6): p. 497-502.
99. Terdiman, J.P., et al., Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology*, 2001. 120(1): p. 21-30.
100. Weber, T.K., et al., Novel hMLH1 and hMSH2 germline mutations in African Americans with colorectal cancer. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 1999. 281(24): p. 2316-2320.
101. Christensen, M., et al., Antibody-based screening for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma compared with microsatellite analysis and sequencing. *Cancer*, 2002. 95(11): p. 2422-2430.
102. Rossi, B.M., et al., hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 2002. 9(6): p. 555-561.
103. Otway, R., et al., Evaluation of enzymatic mutation detection (TM) in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Human Mutation*, 2000. 16(1): p. 61-67.
104. Gurin, C.C., et al., Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Research*, 1999. 59(2): p. 462-466.

105. Aissi-Ben Moussa, S., et al., Lynch syndrome in Tunisia: first description of clinical features and germline mutations. *International Journal of Colorectal Disease*. 26(4): p. 455-467.
106. Colombino, M., et al., Microsatellite instability and mutation analysis among southern Italian patients with colorectal carcinoma: detection of different alterations accounting of MLH1 and MSH2 inactivation in familial cases. *Annals of Oncology*, 2003. 14(10): p. 1530-1536.
107. Losi, L., et al., Molecular genetic alterations and clinical features in early-onset colorectal carcinomas and their role for the recognition of hereditary cancer syndromes. *American Journal of Gastroenterology*, 2005. 100(10): p. 2280-2287.
108. Duraturo, F., *Analisi Mutazionale dei geni dell Mismatch Repair mediante tecniche innovative in pazienti affetti da cancro ereditario non poliposico del colon-retto*. Dissertation Universität Napoli, 2006.

---

**Teile der Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:**

Kosinski J\*, **Hinrichsen I\***, Bujnicki JM, Friedhoff P, Plotz G (2010)  
Identification of Lynch syndrome mutations in the MLH1-PMS2 interface that disturb dimerization and mismatch repair. *Human Mutation* 31(8)975-82

\* Die Autoren haben zu gleichen Teilen zur Arbeit beigetragen

**Hinrichsen I**, Brieger A, Trojan J, Zeuzem S, Dominguez Valentin M, Nilbert M, Plotz G  
A clinically validated expression defect threshold for pathogenicity assessment of unclassified *MLH1* variants. *In Vorbereitung*

**Tagungsbeiträge:**

**Hinrichsen I**, Zeuzem S, Plotz G, Analysis of unclassified MLH1 Variants (Poster) *UTC Science Day*, Frankfurt, 9. Sep 2011

**Hinrichsen I**, Brieger A, Zeuzem S, Plotz G, Characterization of MLH1 missense mutations, *Responses to DNA damage: from molecular mechanism to human disease*, Egmond aan Zee, the Netherlands 3. – 8. April 2011

**Hinrichsen I**, Zeuzem S, Plotz G, Screening of MLH1 mutants, *11 th biannual DGDR Meeting, German Society on DNA repair*, Jena, 7. – 10. Sep 2010

**Hinrichsen I**, Zeuzem S, Plotz G, Analysis of mutants of the human DNA mismatch repair enzyme MLH1 (Poster) *Annual Conference of the German Genetics Society*, Köln, 16. - 19. Sep 2009

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist in der Zeit von September 2008 bis Dezember 2011 im Biomedizinischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik 1 des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität entstanden. Ich danke Herrn Prof. Dr. Zeuzem, dem Direktor der Klinik, für die Möglichkeit, dort arbeiten zu können, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die hervorragende Laborausstattung.

Herrn Prof. Dr. Kempken danke ich dafür, dass er nicht nur die Betreuung meiner Arbeit als Doktorvater übernommen hat, sondern besonders für seine Anregungen, sowie für das Interesse am Fortgang der Arbeit und meiner beruflichen Zukunft.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. Schulenburg für seine Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen, danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Guido Plotz für die gute Betreuung, die vielen Anregungen und langen Diskussionen. Außerdem danke ich ihm für die lustige gemeinsame Zeit mit Überlegungen zum Biorhythmus, Flusskrebsen und Lateinlehrerinnen.

Bei Dr. Angela Brieger möchte ich mich für viele Ratschläge und aufbauende Worte bedanken, sowie für die Möglichkeit auch weiter an diesem spannenden Thema zu arbeiten.

Dr. Jan Kosiński danke ich für Zusammenarbeit zur Dimerisierungsfläche von MLH1 und PMS2. Bei Katrien Busschots möchte ich mich für ihre Hilfe mit dem Thermal-Shift-Assay bedanken und bei Angelika Bauer für die Zusammenarbeit bei der Vernetzung von Proteinen.

Bei Sandra Paßmann möchte ich mich nicht nur für ihre Unterstützung im Labor, besonders zu Beginn der Arbeit, bedanken, sondern auch für die schöne, unterhaltsame und lustige Zeit, die wir gemeinsam im Labor hatten. Ohne Sandra wäre die Zeit im Labor nicht so schnell vergangen und der Laboralltag hätte nicht so viel Spaß gemacht.

Dr. Simone Susser danke ich für die Kaffeepausen mit Diskussionen Wissenschaft und „richtigem“ Leben, die besonders das Zusammenschreiben verschönert haben.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Kollegen möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre im Labor bedanken, insbesondere bei Sandra Paßmann, Angelika Bauer, Simone Susser und Thomas Pleli.

Außerdem danke ich meiner Familie und ganz besonders Norbert für die Unterstützung.



---

## Lebenslauf

### Inga Malena Hinrichsen

geboren am 29. Mai 1983  
in Bremen

#### Staatsangehörigkeit

deutsch

#### Schulbildung

1989 – 1993

Grundschule am Mönchshof, Bremen

1993 – 1999

Gesamtschule, Schulverbund Lesum, Bremen

1999 – 2002

Gymnasiale Oberstufe, Schulzentrum an der Alwin-Lonke-Straße, Bremen

#### Studium

Oktober 2002 - Oktober 2007

Studium Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Hauptfach: Botanik

Nebenfächer: Zellbiologie und Toxikologie

Diplomarbeit zum Thema „*In organello* RNA-Edierung in Mitochondrien von ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen“ in der Abteilung „Botanische Genetik und Molekularbiologie“ bei Prof. Dr. Kempken

Oktober 2007- April 2008

Praktikum bei ALDEBARAN: Vorbereitung und Teilnahme an der 3-monatigen Expedition „Meeresuniversum“ nach Belize

Seit Sep 2008

Durchführung von experimentellen Arbeiten zur Promotion im Fach Zellbiologie im „Biomedizinischen Forschungslabor“, Innere Medizin 1 bei Prof. Dr. Zeuzem, Klinikum und Fachbereich Medizin Goethe-Universität, Frankfurt am Main, unter Betreuung von Prof. Dr. Kempken, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

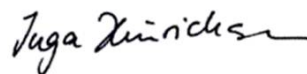
---

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch Prof. Dr. Kempken und meinen Betreuer Dr. Guido Plotz – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist und nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Es wurden – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die wörtlich oder inhaltlich anderen Quellen entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.



Frankfurt, den 10.01.2012

Inga Malena Hinrichsen