

Aus der Abteilung für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Varianten der Reparaturgene *RAD51*, *XRCC2*,
XRCC3 und *XRCC4* beim bilateralen
Mammakarzinom**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von Katrin Gerriets
aus Wilhelmshaven

Hannover 2007

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am: 18.12.2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Peter Hillemanns

Referent: Prof. Dr. Michael Bremer

Korreferent: PD Dr. Reinhard von Wasielewski

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008

Promotionsausschussmitglieder:

Prof. Dr. Hans Heinrich Günter

PD Dr. Rainer Lück

PD Dr. Heike Bantel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen bedanken, die zu dem Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Christof Sohn und Herrn Prof. Dr. Peter Hillemanns möchte ich dafür danken, dass mir ermöglicht wurde meine Doktorarbeit in der Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe unter ihrer Leitung anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Johann H. Karstens möchte ich für die Zusammenarbeit mit der Klinik für Radioonkologie und Strahlentherapie sowie der finanziellen Förderung des Projektes danken. Darüber hinaus möchte ich mich dafür bedanken, dass ich Gelegenheit bekam alle notwendigen klinischen Daten für diese Arbeit in der Abteilung für Radioonkologie und Strahlentherapie zu erfassen. Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Michael Bremer sowie den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik für das Zusammentragen der Patientenproben mit ausführlicher Anamneseerhebung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thilo Dörk für die Festlegung dieses interessanten Dissertationsthemas. Seine umfassende Betreuung und Beratung beim Anfertigen dieser Arbeit haben in ganz erheblichen Maß zu ihrem Gelingen beigetragen. Vielmals möchte ich mich auch für seine finanzielle Unterstützung beim Besuch von wissenschaftlichen Kongressen bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. Regina Waltes für ihre wertvollen fachlichen Anregungen und Ratschläge insbesondere bei der Anfertigung der Proteinanalysen.

Weiterhin möchte ich mich vielmals bei Herrn Prof. Dr. Hartmut Hecker und dem Institut für Biometrie für die Zusammenarbeit bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Horst-Werner Stürzbecher und dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Lübeck für die Kooperation bei den Expressionsanalysen des *RAD51*-Gens und seine freundliche Zusendung des monoklonalen anti-RAD51-Antikörpers danken.

Herrn PD Dr. Markus Stumm (Universität Magdeburg), Herrn Prof. Dr. Detlev Schindler (Universität Würzburg), Frau Dr. Corry Weemaes (Universität Rotterdam) und Frau Dr. Raymonda Varon-Mateeva (Universität Berlin) möchte ich für die Bereitstellung einiger NBSLD-Zelllinien danken.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber (Universität Würzburg) möchte ich für die Überlassung von 20 DNA-Proben männlicher Brustkrebspatienten danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des molekulargenetischen Labors der Abteilung I für Frauenheilkunde und Geburtshilfe für das familiäre Arbeitsklima bedanken. Ein ganz spezieller Dank gilt den Doktorandinnen Paria Yamini, Sandra Beussel, Kim HagMi sowie Natascha Bogdanova für die gute kollegiale Zusammenarbeit und die vielen netten Gespräche, welche mir durch die Hochs und Tiefs des Laboralltags halfen.

Ganz besonders möchte ich meinem Partner Sebastian Schiebe danken für seine unterstützende Begleitung während der langen Arbeit an dieser Dissertation.

Schließlich danke ich meinem Vater Günter Gerriets dafür, dass er mich seit jeher gefördert und mir so vieles ermöglicht hat. Ihm möchte ich diese Arbeit widmen.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG.....	3
INHALTSVERZEICHNIS.....	5
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 EINFÜHRUNG.....	9
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE DES MAMMAKARZINOMS	9
1.1.2 DIAGNOSE UND THERAPIE DES MAMMAKARZINOMS.....	10
1.1.3 NEUE PRÄVENTIONS- UND THERAPIEANSÄTZE DES MAMMAKARZINOMS.....	14
1.2 MOLEKULARGENETISCHE URSACHEN DES MAMMAKARZINOMS	16
1.2.1 EINFÜHRUNG.....	16
1.2.2 BRCA1	18
1.2.3 BRCA2 UND RAD51	20
1.2.4 DIE RAD51 PARALOGEN PROTEINE	23
1.2.5 „NON-HOMOLOGOUS END-JOINING“ (NHEJ) UND DIE ROLLE VON XRCC4	25
1.2.6 ATM.....	29
1.2.7 NBS1.....	31
1.3 DAS BILATERALE MAMMAKARZINOM.....	32
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	34
1.5 VORSTELLUNG DER PATIENTENKOLLEKTIVE	34
2 MATERIAL	38
2.1 CHEMIKALIEN	38
2.1.1 ALLGEMEINE CHEMIKALIEN.....	38
2.1.2 ENZYME UND BIOLOGISCHE SUBSTANZEN	39
2.1.2.1 Antikörper.....	39
2.1.2.2 DNA-Marker.....	39
2.1.2.3 Protein-Marker.....	39
2.1.2.4 Zellkulturmedien und Zubehör	40
2.1.3 KITS UND SPEZIELLE CHEMIKALIEN	40
2.2 GERÄTE	41
2.3 FILME	42
2.4 KLEINMATERIALIEN	42

2.5	STANDARDLÖSUNGEN, -MEDIEN UND PUFFER.....	43
3	<u>METHODEN.....</u>	45
3.1	EXTRAKTION VON NUKLEINSÄUREN	45
3.1.1	DNA-ISOLIERUNG AUS VOLLBLUT.....	45
3.1.1.1	Methode	45
3.1.1.2	Lösungen und Proteolyseansatz zur DNA-Isolierung	46
3.1.2	RNA-ISOLIERUNG AUS LYMPHOBLASTOIDER ZELLKULTUR.....	47
3.1.2.1	Methode	47
3.1.2.2	Lösungen und Puffer.....	48
3.1.3	PEG-PRÄZIPITATION.....	49
3.2	POLYMERASE-KETTENREAKTION	50
3.2.1	ÜBER DAS VERFAHREN.....	50
3.2.2	VERWENDETE PROGRAMME, REAKTIONSANSÄTZE UND PRIMER	51
3.3	REVERSE TRANSKRIPTION	53
3.4	RESTRIKTIONSENZYMATISCHE SPALTUNG	54
3.4.1	RESTRIKTIONSENZYME.....	54
3.4.2	DAS VERFAHREN	54
3.5	TRENNUNG VON NUKLEINSÄUREFRAGMENTEN MITTELS GELELEKTROPHORESE.....	57
3.5.1	DAS VERFAHREN	57
3.5.2	AGAROSEGELELEKTROPHORESE.....	57
3.5.2.1	Durchführung der Methode	58
3.5.2.2	Gellösungen, Puffer und Marker	59
3.5.3	DENATURIERENDE SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE).....	59
3.5.3.1	Das Verfahren.....	59
3.5.3.2	Durchführung der Methode	60
3.5.3.3	Gellösungen und Puffer	61
3.6	SEQUENZIERUNG MIT DEM ABI PRISM 310 GENETIC ANALYSER.....	62
3.6.1	DAS VERFAHREN	62
3.6.2	DURCHFÜHRUNG.....	62
3.7	FRAGMENTLÄNGENANALYSE MIT DEM ABI PRISM 310 GENETIC ANALYSER.....	64
3.7.1	METHODE.....	64
3.7.2	DURCHFÜHRUNG.....	64
3.8	ZELLKULTUR AUS LYMPHOZYTEN.....	65
3.8.1	METHODE.....	65
3.8.2	ANLEGEN EINER LYMPHOBLASTOIDEN ZELLINIE AUS HEPARINISIERTEM VOLLBLUT	65
3.8.3	BESTRAHLUNG DER ZELLINIEN	66

3.9 LAMBDA-PROTEIN-PHOSPHATASE-BEHANDLUNG	67
3.9.1 METHODE.....	67
3.10 PROTEINEXTRAKTION UND –KONZENTRATIONSBESTIMMUNG.....	68
3.10.1 PROTEINEXTRAKTION.....	68
3.10.2 PHOTOMETRISCHE PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG NACH BRADFORD.....	69
3.11 WESTERN BLOT.....	70
3.11.1 METHODE.....	70
3.11.2 DURCHFÜHRUNG.....	70
<u>4 ERGEBNISSE.....</u>	<u>73</u>
4.1 DIREKTE MUTATIONSANALYSE	73
4.1.1 <i>RAD51</i> *135G>C-SCREENING.....	73
4.1.2 <i>RAD51</i> *135G>C BEI MÄNNLICHEN BRUSTKREBSPATIENTEN	74
4.1.3 <i>XRCC2</i> -MUTATION R188H (c.563G>A).....	74
4.1.4 <i>XRCC3</i> -MUTATION T241M (c.722C>T).....	75
4.1.5 SEQUENZIERUNG DER <i>RAD51</i> -PROMOTORVARIANTE 135G>C	77
4.2 MUTATIONSSUCHE IM <i>XRCC4</i>-GEN.....	79
4.2.1 EINLEITUNG	79
4.2.1.1 Methodische Etablierung.....	79
4.2.1.2 Sequenzierung des Exons 3	80
4.2.1.3 Sequenzierung des Exons 4/ <i>XRCC4</i> *I134T (c.401T>C).....	81
4.2.1.4 Sequenzierung des Exons 8/Spleißmutation <i>IVS7-1G>A</i>	82
4.2.1.5 Sequenzierung des Exons 8/Polymorphismus Exon 8 (c.921T>G).....	83
4.3 DIREKTE <i>XRCC4</i>-MUTATIONSANALYSE BEI BRUSTKREBSPATIENTINNEN.....	84
4.3.1 DIREKTES TESTVERFAHREN FÜR DIE SUBSTITUTION <i>XRCC4</i> *I134T (c.401T>C)	84
4.3.2 DIREKTES TESTVERFAHREN FÜR DIE SPLEIßMUTATION <i>XRCC4</i> * <i>IVS7-1G>A</i>	85
4.3.3 DIREKTES TESTVERFAHREN FÜR DIE SYNONYME VARIANTE IN EXON 8, c.921 T>G.....	86
4.4 FUNKTIONELLE ANALYSE DER <i>RAD51</i>-PROMOTORVARIANTE 135 G>C	87
4.4.1 EINFÜHRUNG.....	87
4.4.2 RT-PCR ANALYSE.....	87
4.4.3 SEQUENZIERUNG VON RT-PCR-PRODUKTEN DER <i>RAD51</i> -PROMOTORVARIANTE.....	90
4.4.4 WESTERN BLOT-ANALYSE	91
4.5 FUNKTIONELLE ANALYSE DER SPLEIßMUTATION <i>XRCC4</i>*<i>IVS7-1G>A</i>	92
4.5.1 EINFÜHRUNG.....	92
4.5.2 SEQUENZIERUNG DER RT-PCR-PRODUKTE	92
4.5.3 FRAGMENTLÄNGENANALYSE	94
4.5.4 STRAHLENINDUZIERTER <i>XRCC4</i> -PHOSPHORYLIERUNG	95

4.6	ZUSAMMENFASSUNG DER ALLELFREQUENZEN UND KLINISCHE AUSWERTUNG DER UNTERSUCHTEN POLYMORPHISMEN UND MUTATIONEN.....	98
4.6.1	ALLELFREQUENZEN	98
4.6.2	TRÄGERFREQUENZEN/ODDS RATIOS.....	99
4.6.3	KLINISCH-STATISTISCHE AUSWERTUNG	101
4.6.3.1	Einfluss auf den Lymphknotenstatus.....	101
4.6.3.2	Grading invasiv duktaler Mammakarzinome	102
4.6.3.3	Tumorstadium.....	104
4.6.3.4	Fernmetastasierung	105
4.6.3.5	Mittleres Alter bei Erstdiagnose	107
4.6.3.6	Familienanamnese	109
5	<u>DISKUSSION.....</u>	110
5.1	DISKUSSION DER <i>RAD51</i> *135G>C-PROMOTORVARIANTE.....	110
5.2	DISKUSSION DER VARIANTEN <i>XRCC2</i> *R188H UND <i>XRCC3</i> *T241M	115
5.3	DISKUSSION DER <i>XRCC4</i> MUTATIONEN I134T UND IVS7-1G>A	121
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	127
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	129
8	<u>ANHANG.....</u>	143
8.1	ÜBERSICHT BILATERAL- UND UNILATERAL-KOLLEKTIV.....	143
8.2	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	144
8.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	148
8.4	TABELLENVERZEICHNIS	149
9	<u>LEBENS LAUF.....</u>	151
10	<u>WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN</u>	152
	<u>ERKLÄRUNG.....</u>	154

1 Einleitung

1.1 Einführung

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist schon seit mehreren Jahrhunderten Gegenstand wissenschaftlicher Arbeit. Während man im 17. Jahrhundert mittels Nekrotisierung versuchte, die Patientin zumindest palliativ zu therapieren, trat im 18. und 19. Jahrhundert die radikale operative Tumorentfernung in den Vordergrund (Grischke et al., 2000). Heute im neuen Jahrtausend erkranken in Deutschland bei immer noch steigender Inzidenz jährlich ca. 55.000 Frauen neu an Brustkrebs, 18.000 versterben pro Jahr an dessen Folgen (Bertz et al., 2006). Damit ist das Mammakarzinom mit 26,8 % aller Krebsneuerkrankungsfälle die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau in Deutschland. Die Erkrankungsraten für Deutschland liegen im europäischen Vergleich im mittleren Bereich, während in den Beneluxstaaten sowie Skandinavien, Frankreich und Großbritannien die Inzidenz höher ist, liegen die Erkrankungsraten in baltischen sowie ost- und südeuropäischen Ländern teilweise deutlich niedriger (Bertz et al., 2006). Die Ätiologie der Erkrankung ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Als Risikofaktoren gelten unter anderem ein vorangehendes Mammakarzinom derselben oder der anderen Brust sowie eine familiäre Prädisposition. Man geht heute davon aus, dass ca. 10 % aller Brustkrebsfälle vorwiegend erblich bedingt sind (Beckmann et al., 2002), wenn auch die Mehrzahl aller Brustkrebserkrankungen durch genetische Faktoren disponiert sein dürfte (Pharoah et al., 2002). Einigkeit besteht darüber, dass die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung das Brustkrebsrisiko erhöht (Gross et al., 1998). Hier wird die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen als ursächlich angesehen. Auch andere exogene Noxen wie Nikotin- und Alkoholkonsum führen über die Entstehung von freien Radikalen zur Entstehung von DNA-Schäden und prädisponieren zur Brustkrebsentstehung (Kang, 2002). Weitere Risikofaktoren wie Übergewicht durch hochkalorische, fettreiche und vitaminarme Ernährung sowie Bewegungsmangel werden mit dem weiteren Anstieg der Inzidenz des Mammakarzinoms in Verbindung gesetzt (Barnett et al., 2003). Als begünstigende endokrinologische Faktoren in der Ätiologie des Mammakarzinoms werden eine späte Menopause, eine späte Erstschwangerschaft oder Kinderlosigkeit sowie eine kurze Stillzeit angenommen (Pfleiderer et al., 1999). Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva erhöhen das Brustkrebsrisiko geringfügig wie eine Metaanalyse mit 50.000 Fällen und 100.000 Kontrollen belegte. Hiernach traten innerhalb der

ersten zehn Jahre nach deren Absetzen unter 10.000 Frauen 4,7 zusätzlich Brustkrebsfälle auf (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996). Zu dem Ergebnis, dass durch die Einnahme von oralen Kontrazeptiva das Risiko an prämenopausalem Brustkrebs zu erkranken erhöht ist, kommt die Mayo-Klinik in einer im letzten Jahr veröffentlichten, wesentlich kleiner angelegten Metaanalyse. Das Brustkrebsrisiko wurde demzufolge als besonders ausgeprägt beschrieben, wenn die Frauen vor der ersten Schwangerschaft orale Kontrazeptiva eingenommen hatten (Kahlenborn et al., 2006). Kritiker bezweifeln jedoch die Übertragbarkeit dieser Metanalyse, welche teilweise Fall-Kontroll-Studien aus den 1980er Jahren aufarbeitet, auf die heute im üblichen niedrigeren Dosierungen der oralen Kontrazeptiva (www. aerzteblatt. de, 2006). Seit 2002 ist die in der Vergangenheit wenig umstrittene Hormonsubstitutionstherapie im Klimakterium und der Postmenopause durch die Publikation der Women's Health Initiative (WHI) zum Diskussionsgegenstand geworden. Die WHI-Studie war nach einer Zwischenauswertung abgebrochen worden, als bei Anwenderinnen von Östrogen-Gestagen-Präparaten signifikant erhöhte Inzidenzen von Brustkrebs und kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen worden waren. Nach aktueller Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe sollte aus diesem Grund eine Hormontherapie nur bei bestehender Indikation und unter einer gemeinsamen Nutzen-Risiko-Abwägung mit der Patientin erfolgen (Ortmann et al., 2005). Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse des Northern California Cancer Center postulieren bereits einen Rückgang der Brustkrebsinzidenz bei 50- bis 74-jährigen Frauen um ca. 10 % seit den Ergebnissen der WHI-Studie und dem damit verbundenen Einbruch der Hormonersatztherapie (Clarke et al., 2006). Zusammenfassend ist von einer multifaktoriellen Genese der Brustkrebserkrankung auszugehen, welche bezüglich der Präventions- und Therapieoptionen viele Ansatzpunkte bietet.

1.1.2 Diagnose und Therapie des Mammakarzinoms

Trotz der steigenden Inzidenz ist seit Mitte der 1990er Jahre die Mortalität der Brustkrebserkrankung in Deutschland leicht rückläufig. Die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate für Brustkrebspatientinnen beträgt mittlerweile ca. 79 % (Bertz et al., 2006). Diese positive Entwicklung wird einer verbesserten Früherkennung und dem konsequenten Einsatz von systemischen Behandlungsmaßnahmen zugeschrieben (Eucker et al., 2006). In vielen Fällen wird ein Mammakarzinom von der Patientin selbst zum ersten Mal getastet. Meistens liegt dann bereits ein invasives Karzinom vor. Das Frühstadium des *Carcinoma in situ* kann am besten mit der Mammographie nachgewiesen werden. Viele Mammakarzinome, insbesondere die älterer Frauen, haben ein langes präklinisches Stadium, in dem sie, falls sie

diagnostiziert werden, kurativ therapiert werden können. Mehrere international randomisiert kontrollierte Studien erbrachten den Nachweis, dass ein Mammographiescreening als Maßnahme zur Senkung der Brustkrebssterblichkeit effektiv ist (Hübel et al., 2003). In vielen Ländern Europas sowie den Vereinigten Staaten und Kanada wurden daraufhin Mammographie-Screeningprogramme initiiert. In einigen dieser Länder konnte bereits ihre Flächendeckung erreicht werden. In Deutschland wird derzeit ein strukturiertes Mammographie-Screening-Programm für Frauen im Alter von 50-69 Jahren zur Früherkennung flächendeckend von Ärzten und Krankenkassen in Kooperation mit den Bundesländern eingeführt (Bertz et al., 2006).

80 Jahre war die radikale Mastektomie nach Halsted die Therapie der Wahl beim Mammakarzinom. 1969 wurde von der Weltgesundheitsorganisation eine randomisierte Studie genehmigt, welche die Mastektomie mit dem brusterhaltenden Verfahren der Quadrantenresektion vergleichen sollte. Schon in den ersten Jahren zeigten beide Verfahren gleiche Ergebnisse bezüglich der Überlebensrate. Die Ergebnisse einer 20-jährigen Verlaufsbeobachtung wurden vor einigen Jahren vom Erstautor veröffentlicht. Demnach traten nach brusterhaltender Therapie häufiger Rezidive auf als nach ablativer Operation, die Überlebensraten bei beiden Verfahren waren jedoch vergleichbar (Veronesi et al., 2002). Mittlerweile ist die brusterhaltende Therapie (BET) mit offener axillärer Lymphadenektomie die Standardoperationsmethode. Kontraindikationen der BET sind heute ein ausgedehntes Tumorwachstum, multizentrische Tumoren, eine inkomplette Tumorentfernung sowie eine *Lymphangiosis carcinomatosa* (Preiß et al., 2005). Da die axilläre Lymphadenektomie jedoch im Hinblick auf die Metastasensuche einen primär prognostischen Charakter hat, kommt neuerdings auch die „Sentinel Lymph Node-Biopsie“ als Alternative in Frage und wird zurzeit im Rahmen von Studien durchgeführt (Dall et al., 2003). Im Anschluss an die brusterhaltende Therapie wird heute eine fraktionierte Bestrahlung der Brust bis zu einer Gesamtdosis von 45-54 Gy mit oder ohne Boostbestrahlung des Tumorbettes durchgeführt. Als gesichert gilt, dass die Rate an Lokalrezidiven ohne Nachbestrahlung signifikant höher liegt (Malmstrom et al., 2003).

Einen wichtigen Stellenwert in der Therapie des Mammakarzinoms nehmen neoadjuvante und adjuvante Therapieoptionen ein. Hier wären vor allem die Polychemotherapie und die antiöstrogene Therapie zu nennen. Der Vorteil einer primär systemischen Chemotherapie als neoadjuvante Therapieform liegt in dem sogenannten „down-staging“ und der damit verbundenen Operabilität lokal weit fortgeschrittener Tumoren. Bei operablen Mammakarzinomen ist der neoadjuvante Einsatz einer systemischer Therapie immer noch

Studien vorbehalten. Bei Tumoren, die bereits in die Lymphknoten metastasiert haben wird im Anschluss an die Operation und Bestrahlung eine adjuvante postoperative Chemotherapie durchgeführt. Derzeit gehören anthracyclinhaltige Dreier- bzw. Zweierkombinationen aus 5-Fluorouracil, Epirubicin oder Adriamycin und Cyclophosphamid (FEC/FAC; EC) sowie Kombinationen aus Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil (CMF) zur Standardtherapie. In einer groß angelegten Metaanalyse, welche die Ergebnisse von 15-jähriger zytostatischer und antihormoneller Therapie des Mammakarzinoms in über 145.000 Krankheitsverläufen beinhaltet, konnte jedoch gezeigt werden, dass die Wirksamkeit bezüglich des Gesamtüberlebens adjuvanter zytostatischer Standardtherapiemaßnahmen mit zunehmenden Alter der Patientin erheblich abnimmt. Prämenopausale Patientinnen profitieren demnach am meisten von einer adjuvanten Chemotherapie (Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group, 2005). Andere Daten belegen ferner die Überlegenheit einer dosisintensiven taxanhaltigen Chemotherapie in Bezug auf das rezidivfreie Überleben und die Gesamtüberlebenszeit beim nodalpositiven Mammakarzinom in der adjuvanten Therapiesituation (Nabholtz et al., 2002). Zu diesem Resultat kommen auch die Autoren einer kürzlich veröffentlichten Metaanalyse, welche zusätzlich einen Therapievorteil bei Patientinnen mit hormonrezeptornegativen Tumoren durch den Einsatz von Taxanen (Doxetaxel, Paclitaxel) postulieren (Bria et al., 2006). Für hormonrezeptorpositive Tumoren wird die antiöstrogene Therapie mit Tamoxifen über fünf Jahre als Standard empfohlen. Hierdurch lässt sich neueren Daten zufolge das Rezidivrisiko von 45 % auf 33,2 % und das Mortalitätsrisiko von 34,8 % auf 24,6 % senken. (Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group, 2005). Eine Tamoxifentherapie über fünf Jahre hinaus ist aufgrund des Anstieges der nicht brustkrebsbedingten Mortalität durch Thromboembolien und Endometriumkarzinome nicht zu empfehlen. Bei Vorliegen von Kontraindikationen oder Nebenwirkungen können Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Tumoren anstelle von Tamoxifen auch mit dem Aromataseinhibitor Anastrozol behandelt werden (Preiß et al., 2005). Für Aromatasehemmer wurde bei postmenopausalen Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Tumoren als erste antihormonelle Therapie hinsichtlich eines rezidivfreien Überlebens und einer Fernmetastasierung eine bessere Wirksamkeit als für Tamoxifen nachgewiesen (Howell et al., 2005). In einer sogenannten „switch“-Therapie mit dreijähriger Vorbehandlung durch Tamoxifen und anschließendem Wechsel auf Anastrozol konnte nicht nur die Rezidivfreiheit, sondern auch die Gesamtüberlebenszeit bei postmenopausalen Patientinnen verbessert werden (Eucker et al., 2006).

HER2/neu überexprimierende Mammakarzinome haben eine gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität. Sie neigen hierdurch zu einer gesteigerten Proliferation und Entdifferenzierung und haben somit eine deutlich ungünstigere Prognose. Es konnte gezeigt werden, dass bei metastasierten, HER2/neu überexprimierenden Mammakarzinomen die Gabe des monoklonalen rekombinaten HER2/neu-Rezeptorantikörpers Trastuzumab (Herceptin) zusätzlich zu einer Chemotherapie einen additiven und vermutlich auch synergistischen Effekt aufweist (Slamon et al., 2001). Nachdem bei Fernmetastasierung eindrucksvolle Tumorremissionen und signifikant verlängerte Überlebenszeiten um ca. 25 % unter Trastuzumab nachgewiesen werden konnten (Baselga et al., 2001), wurde Trastuzumab zur Standardtherapie beim metastasierten HER2/neu überexprimierenden Mammakarzinom. Seit Mai 2006 ist Trastuzumab auch für die adjuvante Therapie des HER2/neu überexprimierenden Mammakarzinoms zugelassen. Die Zulassung in Europa beruht im Wesentlichen auf den Daten der internationalen, randomisierten HERA (HERceptin Adjuvant)-Studie. Nach vorausgegangener Operation, Strahlentherapie und Polychemotherapie war nach zusätzlicher adjuvanter Therapie mit Trastuzumab eine signifikante Verlängerung des rezidivfreien Intervalls sowie des Gesamtüberlebens festgestellt worden (Piccart-Gebhart et al., 2005). Die Effizienzdaten einer zweijährigen Therapie mit Trastuzumab stehen noch aus und werden voraussichtlich im Jahre 2008 verfügbar sein. Aufgrund der unterschiedlichen Krankheitsverläufe beim metastasierten Mammakarzinom sollte die Behandlung hierbei individualisiert erfolgen. Obwohl vereinzelt Daten über eine komplette Remission in dieser Krankheitssituation vorliegen, muss das metastasierte Mammakarzinom nach wie vor als nicht heilbare Erkrankung angesehen werden (Sauer, 2005). Aus diesem Grund sollte die palliative Therapie darauf abzielen, bestehende Symptome zu lindern und die Lebensqualität der Patientin zu verbessern. Bei lokalen Rezidiven sollte der operativen und strahlentherapeutischen Therapie sofern möglich den Vorzug gegeben werden. Neben dem Einsatz von Chemotherapeutika kommt bei Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus und langsamer Progressionsgeschwindigkeit in der metastasierten Krankheitssituation ebenso wie in der adjuvanten Therapie der Einsatz antihormoneller Substanzen in Betracht. Mono- oder Polychemotherapien werden bei symptomatischer Erkrankung mit rascher Tumorprogredienz und negativem Hormonrezeptorstatus empfohlen. Die Auswahl der geeigneten Chemotherapeutika orientiert sich zum einen an der adjuvanten Vortherapie, dem individuellen Krankheitsverlauf sowie an den Bedürfnissen der Patientin. Vereinheitlichte Schemata hierfür existieren bislang nicht (Sauer, 2005).

1.1.3 Neue Präventions- und Therapieansätze des Mammakarzinoms

Die Prävention des Mammakarzinoms stellt einen zentralen Fokus gesundheitspolitischen Denkens dar. Grundsätzlich ist in gewissem Umfang eine individuelle Risikoreduktion bereits durch eine Anpassung von Lebensgewohnheiten zu erreichen. Regelmäßige körperliche Aktivität, Körpergewichtsreduktion und fettarme Ernährung sowie Nikotin- und Alkoholkarenz zeigen einen günstigen Einfluss auf die Risikoreduktion (Sauer, 2005). Eine kontrovers diskutierte Präventionsmethode für Frauen mit hohem familiärem Risiko ist die prophylaktische Mastektomie. Eine im Jahre 2004 veröffentlichte Studie ergab eine 90 % Reduktion der Brustkrebsinzidenz für *BRCAl/2*-Mutationsträgerinnen nach prophylaktischer bilateraler Mastektomie (Rebeck et al., 2004). Dieser Vorteil muss gegen die sich ergebenden psychosozialen Folgen für die betroffene Frau aufgewogen werden.

Neue Hoffnung werden auf eine Chemoprävention des Mammakarzinoms gesetzt. Hier kommen zum einen Medikamente in den Fokus, die sich bereits in der Therapie des Mammakarzinoms als effektiv erwiesen haben. Präventionsstudien mit Tamoxifen ergaben eine Risikoreduktion von ca. 30-40 % bezüglich eines Mammakarzinoms bei Frauen mit hohem familiärem Risiko. Bedingt durch dessen Nebenwirkungen wie thrombembolische Komplikationen und eine erhöhte Inzidenz für ein Endometriumkarzinom scheint der Einsatz von Tamoxifen jedoch nur begrenzt möglich (Cuzick, 2003; Weiss et al., 2003). Der positive Effekt von Anastrozol auf die Rezidivfreiheit von postmenopausalen Patientinnen führte zu Initiierung der Studie IBIS II („International Breast Intervention Study“). Hier wird zurzeit der präventive Effekt von Anastrozol auf postmenopausale Frauen mit hohem familiärem Risiko für eine Brustkrebskrankung getestet (Sauer, 2005). Die Auswertung von Sekundärbeobachtungen der MORE („Multiple Outcomes of Raloxifen Evaluation“)-Studie zeigte eine Reduktion der Brustkrebsinzidenz um ca. 76 % bei postmenopausalen Frauen nach 30-monatiger Einnahme von Raloxifen, einem primär in der Osteoporosebehandlung eingesetzten selektiven Östrogenrezeptormodulator (Cummings et al., 1999). Die Ergebnisse der MORE-Studie führten zur Planung einer Vergleichsstudie zwischen Tamoxifen und Raloxifen. In dieser aktuell in den Vereinigten Staaten laufenden STAR (Study of Tamoxifen And Raloxifen)-Studie werden derzeit ca. 20.000 postmenopausale Frauen mit erhöhtem familiärem Risiko für Brustkrebs über fünf Jahre mit Tamoxifen oder alternativ mit Raloxifen behandelt. Erste Ergebnisse des National Cancer Institutes belegen eine gleich gute Wirksamkeit von Raloxifen in der Brustkrebsprevention (www.cancer.gov/newscenter/press-releases, 2006).

Neue Therapieansätze bei schon bestehendem Mammakarzinom stützen sich zum einen auf die Inhibition der Angiogenese, welche als Grundlage für eine spätere Fernmetastasierung angesehen wird. Für den Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF-A, Bevacizumab, wurde bereits eine monotherapeutische Effektivität bei metastasiertem bereits chemotherapeutisch vorbehandeltem Mammakarzinom nachgewiesen. Bei 9 % der Patientinnen konnte eine Tumorremission, bei 17 % eine Krankheitsstabilisierung erreicht werden (Cobleigh et al., 2003). Da es günstiger erschien Bevacizumab früher in den Behandlungsablauf einzubringen, wurde der monoklonale Antikörper im Rahmen einer Studie zusammen mit Paclitaxel als erste zytostatische Behandlungsmaßnahme eingesetzt. Hierbei ergab sich eine signifikante Zeitverlängerung bis zur erneuten Tumorprogression, ein günstiger Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit konnte bislang jedoch nicht erreicht werden (Eucker et al., 2006). Eine weitere Studie befasst sich aktuell mit der Wirksamkeit des neuen Tyrosinkinaseinhibitors Lapatinib. Im Gegensatz zu Trastuzumab, blockiert Lapatinib von der Zellsseite den HER2/neu-Rezeptor. Bei HER2/neu positivem, metastasiertem, chemotherapeutisch und mit Trastuzumab vorbehandeltem Mammakarzinom konnte die Tumorprogression unter Lapatinib und dem Chemotherapeutikum Capecitabine vorübergehend gestoppt sowie die Inzidenz von Hirnmetastasen verringert werden (www.aerztezeitung.de, 2006). Andere Untersuchungen beschäftigen sich mit Substanzen, welche die Ausbildung von Begleitproteinen („Chaperone“) beeinflussen. Diese Substanzen sollen die Entwicklung eines Begleitproteins des HER2/neu-Rezeptors, HSP-90, hemmen und somit dessen Expression reduzieren. Gegenwärtig befinden sich somit erfreulicherweise einige neue Therapieansätze in der Entwicklung, welche möglicherweise die Prognose des Mammakarzinoms in Zukunft weiter verbessern.

1.2 Molekulargenetische Ursachen des Mammakarzinoms

1.2.1 Einführung

Unverändert besteht ein großes Interesse an den molekulargenetischen Untersuchungen zum Thema Brustkrebsentstehung. Die Identifizierung der Gene *BRCA1* und *BRCA2* und die Tatsache, dass Mutationen in diesen Genen zur Entstehung eines Mamma- und Ovarialkarzinoms prädisponieren, haben in über zehn Jahren zu neuen Einblicken in molekulare Mechanismen der Tumorentstehung geführt (Liu et al., 2002). Bei dem familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinom stehen Mutationen in *BRCA1* oder *BRCA2* unter den genetischen Ursachen im Vordergrund. Man nimmt an, dass ein Drittel aller dominant vererbten Mammakarzinomfälle in einer *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation begründet sind. Epidemiologischen Studien zufolge erkranken über 80 % der *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und ca. 70-80 % der *BRCA2*-Mutationsträgerinnen bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom (Beckmann et al., 2002; King et al., 2003). Eine Mutationsanalyse der beiden Gene ist aufgrund ihrer molekularen Größe aufwändig. Unter der Vielzahl bekannter Genveränderungen dominiert in Deutschland die Insertion 5382insC, welche bei etwa 1 % aller Mammakarzinompatientinnen und bei etwa 4 % aller familiären Mammakarzinomerkrankungen vorliegt (Backe et al., 1999). Die Zugehörigkeit zu Bevölkerungsgruppen mit Gründermutationen wie den Ashkenazim-Juden erhöht die Wahrscheinlichkeit der Trägerschaft einer BRCA-Mutation. Die *BRCA1*-Mutation 185delAG (1,1 %) und die *BRCA2*-Mutation 6174delT (1,5 %) sind die häufigsten Mutationen unter den Ashkenazim (Roa et al., 1996).

Da jedoch bei weitem nicht alle familiären Brustkrebsfälle mit *BRCA1*- bzw. *BRCA2*-Mutationen assoziiert werden können, richtet sich seit einiger Zeit großes Interesse auf die Identifizierung weiterer Brustkrebsgene. In Betracht genommen werden beispielsweise die Produkte von Genen, welche über Protein-Interaktionen in direktem Kontakt mit *BRCA1* bzw. *BRCA2* stehen. Hier wären vor allem Proteine zu nennen, die in den DNA-Reparaturprozess eingreifen.

Ionisierende Strahlung und bestimmte Chemikalien erzeugen DNA-Doppelstrangbrüche, diese können in Säugerzellen auf zwei Wegen repariert werden: zum einen über die homologe Rekombination (HR) und zum anderen über das „non-homologous end-joining“ (NHEJ), welches auch als illegitime Rekombinations-Reparatur bekannt ist (Karran et al., 2000). Auch wenn beide Reparaturvorgänge nicht ausschließlich gesondert voneinander betrachtet werden können, treten beide Vorgänge abhängig von der Phase des Zellzyklus getrennt auf. NHEJ

dominiert in der G1-Phase, während HR als exaktere Reparaturoption in der S- und G2-Phase hinzu kommt (West, 2003). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die Signalwege in der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur. Linksseitig wird der NHEJ- und rechtsseitig der HR-Reparaturweg dargestellt.

Während schwere Defekte von Reparaturgenen mit hoher chromosomaler Instabilität und Zelltod einhergehen, können hypomorphe Defekte, die eine Restfunktion belassen, ggf. toleriert werden. Selbst solche Defekte können jedoch mit einer Tumorentstehung assoziiert sein, da ein reibungsloser Ablauf der DNA-Reparatur für die Integrität des menschlichen Genoms unerlässlich ist. Im Folgenden soll auf einige Reparaturgene näher eingegangen werden.

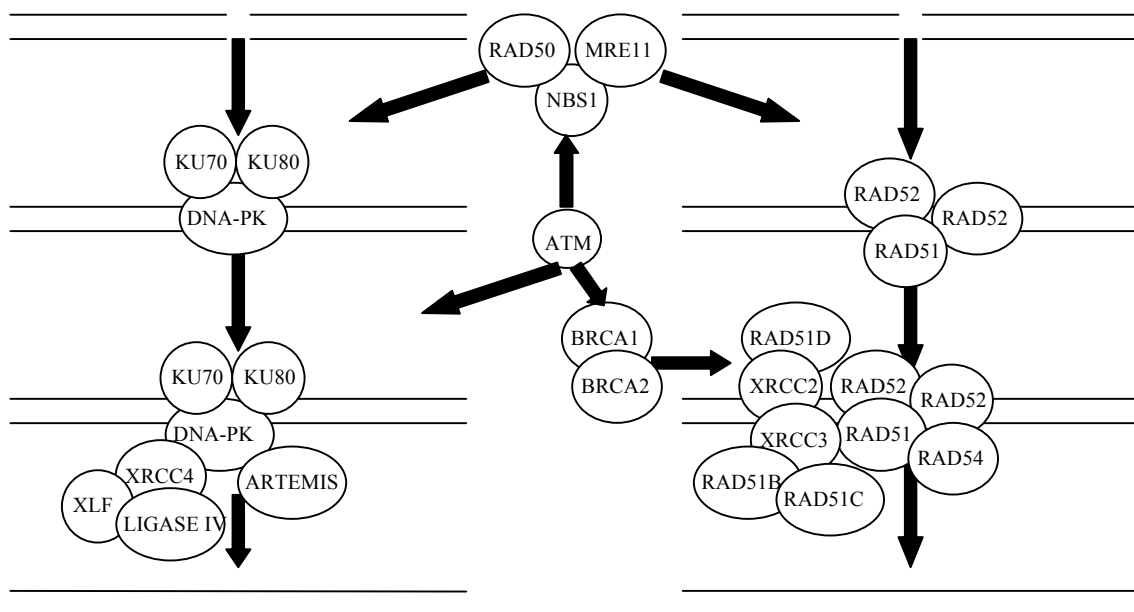


Abbildung 1: Komponenten der Signalwege in der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (modifiziert nach Kuschel et al., 2002)

Der initiale Schritt in beiden dargestellten Reparaturwegen ist das Erkennen und Signalisieren eines DNA-Doppelstrangbruchs durch den NBS1/MRE11/RAD50-Proteinkomplex. Im NHEJ bindet Ku70/80 an die Doppelstrangbruchregion und aktiviert DNA-PKcs. DNA-PK und ARTEMIS besitzen Nuklease-Aktivität; XRCC4, Ligase IV und XLF katalysieren die Ligation. Während der HR wird der DNA-Einzelstrangaustausch durch RAD51 katalysiert und durch Interaktion mit RAD52 und RAD54 erleichtert. Die RAD51 verwandten Proteine RAD51B-D, XRCC2 und XRCC3 sind über eine direkte Interaktion zwischen XRCC3 und RAD51 in die HR involviert. BRCA2 interagiert direkt mit RAD51 und indirekt mit BRCA1. ATM reguliert BRCA1 und NBS1 sowie weitere relevante Reparaturproteine über Phosphorylierung.

1.2.2 BRCA1

Die entscheidende Beobachtung, dass das familiäre Auftreten des Mamma- und Ovarialkarzinoms in einigen Fällen an den Chromosomenabschnitt 17q12-21 gekoppelt ist, führte 1994 zur Identifizierung des *BRCA1*-Gens (Miki et al., 1994). Es handelt sich um ein relativ großes Gen, welches sich über 24 Exons erstreckt und für ein 1863 Aminosäuren langes Protein von 220 kDa kodiert. Dem BRCA1-Protein wird mit seiner Kontrollfunktion innerhalb des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Transkription eine zentrale Rolle zugeschrieben (Venkitaraman et al., 2002). BRCA1 kontrolliert den Eintritt der Zelle in die Mitose (Yarden et al., 2002). Im Hinblick auf die Reparaturfunktion konnte gezeigt werden, dass *BRCA1*-mutationstragende Zellen sensibel auf DNA-schädigende Strahlung reagieren (Foray et al., 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass *BRCA1*-mutationstragende Zellen Defekte aufwiesen in der homologen Rekombination bei DNA-Doppelstrangbrüchen (Moynahan et al., 1999). Darüber hinaus wiesen Zhong et al. (2002) bei BRCA1-defizienten Zelllinien eine herabgesetzte NHEJ-Aktivität nach, was zu der Vermutung führte, dass BRCA1 ebenfalls eine Funktion im NHEJ-Reparaturweg besitzt. DNA-Doppelstrangbrüche werden als wichtige Vorläuferläsionen für Chromosomenaberrationen angesehen (Chen et al., 1998a). Insgesamt werden die Funktionen von BRCA1 durch seine komplexen Protein-Interaktionen bestimmt. Abbildung 2 veranschaulicht funktionelle Domänen des BRCA1-Proteins. An seinem Amino-Terminus besitzt das Protein ein Ringfingermotiv. Ringfinger motive haben die Fähigkeit zur Ubiquitinierung. Ubiquitin-Ligasen ermöglichen die Markierung von Proteinen, welche zum Abbau in Proteasomen vorgesehen sind. Nach der Verknüpfung des Proteins mit Ubiquitin wird dieses durch das Proteasom erkannt und in dessen Innerstes aufgenommen, wo der Abbau stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein BARD1, welches ebenfalls über ein Ringfingermotiv verfügt, mit der Ringfingerdomäne des BRCA1-Proteins interagiert (Wu et al., 1996). Der BARD1/BRCA1 Komplex hat die Funktion einer Ubiquitin-Ligase. Die Substrate für die BARD1/BRCA1-Ligaseaktivität sind bisher nicht vollständig geklärt und schließen möglicherweise auch den Östrogenrezeptor mit ein (Eakin et al., 2007). Eine für Brustkrebs disponierende Mutation innerhalb der Ringfingerdomäne von BRCA1 führt zum Verlust der Aktivität der Ubiquitin-Ligase und zu überhöhter Strahlensensibilität (Ruffner et al., 2001). BRCA1 bildet darüber hinaus mit einer Gruppe von Proteinen einen umfangreichen Komplex, BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex). Hierbei handelt es sich um entscheidende Tumorsuppressor- und DNA-Reparatur-Proteine wie RAD50, MRE11, NBS1 und ATM. Der MRE11/RAD50/NBS1 Komplex taucht bereits in einer initialen Phase von beiden DNA-

Doppelstrangbruchreparaturwegen (HR und NHEJ) auf (siehe Abbildung 1). ATM hingegen reguliert BRCA1 über Phosphorylierung (Cortez et al., 1999). Eine weitere essentielle Domäne des BRCA1-Proteins liegt an seinem Carboxy-Terminus, die sogenannte BRCT-Domäne. Hier tritt BRCA1 mit BACH1/BRIP1, einer 130 kDa großen DNA-Helicase in Interaktion. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einer mutierten Form des BACH1/BRIP1-Proteins (Lys52→Arg) zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung sowie zu einer verminderten DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur führt und mit einem frühen Auftreten von Brustkrebs assoziiert ist (Cantor et al., 2001). Mutationen des *BACH1/BRIP1*-Gens müssen wohl generell zu den genetischen Dispositionen für das Mammakarzinom gezählt werden (Seal et al., 2006). Ferner interagiert BRCA1 mit CtIP, einem Protein welches ursprünglich über Interaktion mit dem Transkriptionssuppressor CtBP identifiziert worden war (Schaeper et al., 1998; Yu et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass ATM CtIP phosphoryliert und hiermit BRCA1 supprimiert (Li et al., 2000). Die BRCT-Tandem-Domäne von BRCA1 ist somit wesentlich an dem Zellzyklusarrest in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beteiligt. Des Weiteren spielt die BRCT-Region eine Rolle in der Aktivierung bestimmter Transkriptionsvorgänge. So bindet hier beispielsweise die RNA-Polymerase II (RNAP II), welche im Rahmen der Transkription die m-RNA-Synthese katalysiert. Keimbahnmutationen in der Carboxy-terminalen Domäne, führen zu einem Verlust der Transkriptionskontrolle durch *BRCA1* und disponieren somit zur Brustkrebsentstehung (Hayes et al., 2000). Bei einigen dieser Brustkrebs-assoziierten Mutationen von *BRCA1* handelt es sich um „truncation-mutations“, hier liegt ein Verlust der Carboxy-terminalen Domäne vor. BRCA1 verfügt des Weiteren über 2 NLS-Motive („nuclear localization signals“), welche über Interaktion mit weiteren Proteinen, wie z. B. BRAP2, den direkten Transport von BRCA1 in den Zellkern vermitteln (Chen et al., 1996; Li et al., 1998). Die oben aufgeführten Protein-Interaktionen von BRCA1 signalisieren dessen Multifunktionalität in Bezug auf den DNA-Metabolismus und die Komplexität der DNA-Reparaturvorgänge. Die präzise biochemische Rolle von BRCA1 bleibt jedoch bislang weitgehend offen.

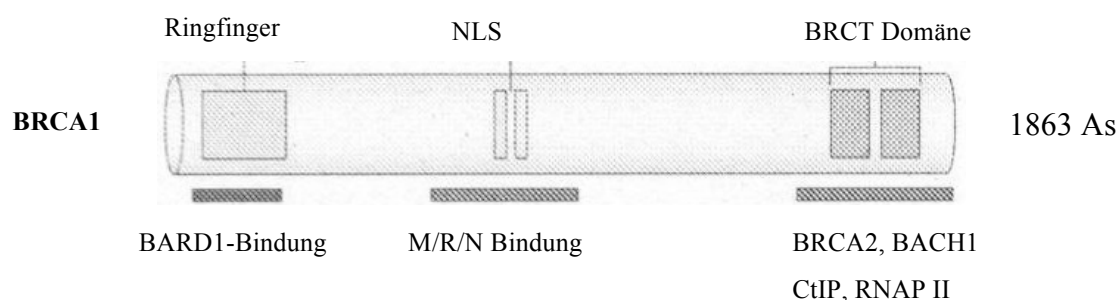


Abbildung 2: Funktionelle Domänen von BRCA1 (nach West, 2003)

BRCA1 verfügt über 1863 Aminosäuren und interagiert mit BARD1, welches Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt. Des Weiteren findet eine Interaktion statt mit dem MRE11/RAD50/NBS1 (M/R/N)-Rekombinations-/Reparaturkomplex. Über 2 NLS-Motive („nuclear localization signals“) wird der Transport von BRCA1 in den Zellkern vermittelt. Am Carboxy-Terminus (BRCT-Domäne) interagiert BRCA1 mit der DNA-Helicase BACH1/BRIP1, dem CtBP-interagierenden Protein CtIP, der RNA-Polymerase II (RNAPII) und BRCA2.

1.2.3 BRCA2 und RAD51

Kurze Zeit nach der Entdeckung des *BRCA1*-Gens konnte auch das zweite Brustkrebsgen *BRCA2* auf dem Chromosomenabschnitt 13q12-13 identifiziert werden (Wooster et al., 1995). Seine 27 Exons kodieren für ein 3418 Aminosäuren langes Protein von 390 kDa Größe. Abbildung 3 veranschaulicht die funktionellen Domänen des Gens. An seinem Amino-Terminus interagiert BRCA2 mit P/CAF, einem Transkriptions-Co-Aktivator mit intrinsischer Histon-Acetyltransferase-Aktivität (Fuks et al., 1998). An seinem Carboxy-Terminus verfügt es ähnlich wie BRCA1 über zwei NLS-Motive „nuclear localization signals“, welche den Transport von BRCA2 in den Zellkern vermitteln. Ferner interagiert BRCA2 mit DSS1 (Marston et al., 1999), einem nur 70 Aminosäuren langen Polypeptid, dessen Verlust zu Hand- und Fußmalformationen („split-hand/split-foot-syndrome“) führt (Crackower et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an funktionstüchtigem DSS1 zu einer Instabilität von BRCA2 und erhöhter Strahlensensibilität führt (Li et al., 2006). Des Weiteren existiert eine BRCA2-Bindungsstelle für den BRCA2-assoziierten Faktor 35 (BRAF35), dessen genaue Funktion bislang noch nicht hinreichend geklärt wurde (Marmorstein et al., 2001). Schließlich interagiert das BRCA2-Protein mit PALB2 („partner and localiser of BRCA2“). PALB2 reguliert die intrazelluläre Lokalisation von BRCA2, und Mutationen des *PALB2*-Gens zählen zu den genetischen Dispositionen für das Mammakarzinom (Rahman et al., 2007; Erkkö et al., 2007). Wie BRCA1-defiziente Zellen zeigen auch BRCA2-defiziente Zellen eine erhöhte Anzahl chromosomaler Aberrationen. Dies führte zu der Annahme, dass sowohl BRCA1 als auch BRCA2 an der Instandhaltung der genomischen Integrität beteiligt

sind und, dass chromosomale Instabilität eine pathogenetische Basis für die Tumorentstehung ist (Welsh et al., 2001). Verschiedene Studien belegen, dass insbesondere die homologe Rekombination (HR) in BRCA2-defizienten Zellen gestört ist, während das „non-homologous end-joining“ (NHEJ) intakt bleibt.

Bei BRCA2 wird die direkte Interaktion mit RAD51 als essenziell für die homologe Rekombinations-Reparatur angesehen (Liu et al., 2002). Bei RAD51 handelt es sich um ein eukaryontisches homologes Protein der *E. coli* Recombinase RecA. Man kam zu diesem Ergebnis, als 1992 die Beobachtung gemacht wurde, dass die Sequenz von RecA und dem Hefeprotein hRad51 zu 30 % übereinstimmt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten weiterhin die strukturelle Ähnlichkeit zwischen RecA und hRad51. Im Gegensatz zu RecA ist RAD51 für die Säugetierzelle essenziell. Das Fehlen von beiden *RAD51*-Allelen führte bei Mäusen zu früher embryonaler Letalität (Lim et al., 1996; Tsuzuki et al., 1996). RAD51 hat die Struktur eines langen helikalen Polymers, welches sich um die DNA windet um Nucleoprotein-Filamente zu formen (Ogawa et al., 1993). Seine Molekulargröße wird mit ungefähr 38 kDa angegeben. Es konnte gezeigt werden, dass RAD51 sowohl an BRCA1 als auch an BRCA2 bindet und in der meiotischen und mitotischen Rekombination sowie im homologen Rekombinationsreparaturweg eine entscheidende Rolle einnimmt (Chen et al., 1998; Scully et al., 1997). RAD51 bindet am 5'-Ende von Exon 11, in einer Region mit sechs BRC-Peptiden, an BRCA2 (Chen et al., 1998). Interaktionen zwischen BRC3 und BRC4 mit RAD51 verhindern dessen Bildung von Nucleoprotein-Filamenten (Davies et al., 2001). Nähere Untersuchungen zeigten, dass die Inaktivierung von RAD51 auf die Bildung eines Fusionsproteins mit BRC4 zurückgeht (Pellegrini et al., 2002). Damit scheint BRCA2 eine Art negativen Kontrollmechanismus über RAD51 auszuüben. Anzunehmen wäre auch, dass BRCA2 eine Art Gerüst bildet, welches RAD51 bis zum Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen inaktiviert (West, 2003). Esashi et al. (2005) berichten über eine zusätzliche Bindungsstelle von RAD51 am Carboxy-Terminus (Exon 27) von BRCA2. Hier wurde eine Zyklinkinasen-abhängige („CDK-dependent“) Phosphorylierung von BRCA2 am Serin 3291 nachgewiesen, welche die Bindungsaktivität zwischen RAD51 und BRCA2 herabsetzt. Diese Phosphorylierung könnte als ein Regulationsmechanismus des homologen Rekombinationsreparaturweges dienen, indem sie bedarfsweise herauf- bzw. herabreguliert wird.

Funktionelle Analysen ergaben, dass RAD51 als Antwort auf DNA-Schäden nukleäre Foci formt, die Einzelstrang-DNA enthalten (Raderschall et al., 1999). Anhand von Vergleichen mit RecA wird vermutet, dass RAD51 nach Nucleoprotein-Filament-Bildung an Einzelstrang-DNA den Strangaustausch zwischen dem geschädigten und unbeschädigten homologen Chromosom oder Schwesterchromatid katalysiert (Sung et al., 1994; West, 2003). Die genauen Abläufe innerhalb der nukleären Foci bedürfen jedoch näherer Untersuchung.

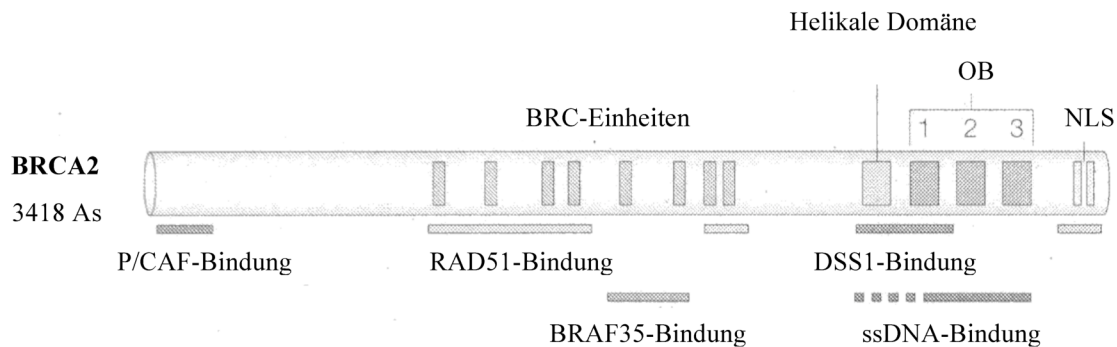


Abbildung 3: Funktionelle Domänen von BRCA2 (nach West, 2003)

BRCA2 ist mit 3418 Aminosäuren ein großes Polypeptid. Am Amino-Terminus interagiert BRCA2 mit der Histone-Acetylase P/CAF. Ferner interagiert BRCA2 mit dem 35 kDa BRCA2-assoziierten Faktor BRAF35 und mit DSS1. Darüber hinaus verfügt es über acht BRC-Einheiten, von denen sechs die Interaktion mit RAD51 ermöglichen. Ferner besitzt BRCA2 Oligonukleotid-Bindungsdomänen (OB), welche mit Einzelstrang-DNA interagieren. Über zwei am Carboxy-Terminus befindliche NLS-Motive („nuclear localization signals“) wird der Transport von bestimmten Proteinen in den Zellkern vermittelt.

1.2.4 Die RAD51 paralogen Proteine

Mittels Studien an strahlensensiblen Zelllinien konnten Mitte der 90er Jahre die Gene *XRCC2* und *XRCC3* kloniert und identifiziert werden (Tebbs et al., 1995; Tambini et al., 1997). Die Analyse ihrer Aminosäuresequenz ergab ca. 25 % Übereinstimmung mit der Sequenz von RAD51 (Cartwright et al., 1998b; Liu et al., 1998). Kurze Zeit später wurden drei weitere RAD51 paraloge Proteine identifiziert, RAD51B, RAD51C und RAD51D (Albala et al., 1997; Dosanjh et al., 1998, Pittmann et al., 2000). Obwohl die präzise Rolle der RAD51-Paralogen im homologen Rekombinationsreparaturweg (HR) bis jetzt noch nicht geklärt ist, gilt als gesichert, dass sie in ihrer Funktion nicht durch andere Proteine auswechselbar sind. Der Verlust nur eines dieser Proteine macht die Zelle sensibel für Noxen, welche DNA-Doppelstrangbrüche induzieren können. Des Weiteren zeigen solche Zellen langsamere Wachstumsraten und weisen Defekte innerhalb des homologen Rekombinationsprozesses mit einem hohen Level an spontanen Chromosomenaberrationen auf (Liu et al., 1998; Takata et al., 2001). Die fünf RAD51 paralogen Proteine bilden zwei Komplexe, den BCDX2-Komplex (RAD51B, RAD51C, RAD51D und XRCC2) und den CX3-Komplex (RAD51C und XRCC3) (Masson et al., 2001). Der BCDX2-Komplex bindet spezifisch an Einzelstrang-DNA. Es wird vermutet, dass er eine frühe Funktion innerhalb des HR einnimmt (Masson et al., 2001). Der CX3-Komplex bindet Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA und ist am homologen DNA-Annealing beteiligt (Kurumizaka et al., 2001). Während RAD51C mit Ausnahme von sieben Aminosäuren des Amino-Terminus komplett an XRCC3 bindet, ist nur die Region XRCC3₆₃₋₃₄₆ an dieser Bindung beteiligt. Eine Deletionsmutation innerhalb dieser XRCC3-Region (Phe249) verursacht eine signifikante Reduktion der CX3-Komplex-Bildung (Kurumizaka et al., 2003). Die ebenfalls in dieser Region identifizierte Aminosäuresubstitution (T241M) ist mit der Entstehung von Brustkrebs assoziiert worden (Kuschel et al., 2002). Andere Studienergebnisse weisen daraufhin, dass XRCC3 möglicherweise zwei unterschiedliche Funktionen innerhalb der homologen Rekombination übernimmt, eine von RAD51 abhängige und eine von RAD51 unabhängige Funktion. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass XRCC3 sich unabhängig von RAD51 an Regionen mit DNA-Doppelstrangbrüchen in nukleären Foci anlagert. Beide Proteine sind ca. zehn Minuten nach Einwirkung von ionisierender Strahlung an DNA-Doppelstrangbrüchen nachweisbar (Forget et al., 2004). Frühere Studien ergaben, dass die Bildung von nukleären RAD51-Foci die Anwesenheit von XRCC3 erfordert (Bishop et al., 1998). Die Vermutung liegt also nahe, dass XRCC3 an der Bildung des RAD51-Nukleoprotein-Filamentes an DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Inwiefern der CX3-Komplex genau daran mitwirkt bleibt

bislang offen. Abbildung 4 zeigt ein Modell für die Interaktionen von BRCA2, RAD51 und XRCC3 an DNA-Doppelstrangbrüchen.

Die Interaktionen des BCDX2-Komplexes sind weniger gut untersucht. Schild et al. (2000) zeigten, dass RAD51B und RAD51C ein Heterodimer bilden, welcher nur in Anwesenheit von RAD51D mit XRCC2 interagiert. Ferner zeigten Masson et al. (2001), dass der BCDX2-Komplex nicht nur an Einzelstrang-DNA bindet, sondern auch an Einzelstrangbrüchen in Doppelstrang-DNA. Dies führte zu der Annahme, dass der BCDX-Komplex an Kreuzvernetzungsstellen bindet und damit den Beginn der Rekombinations-Signalwege einleitet.

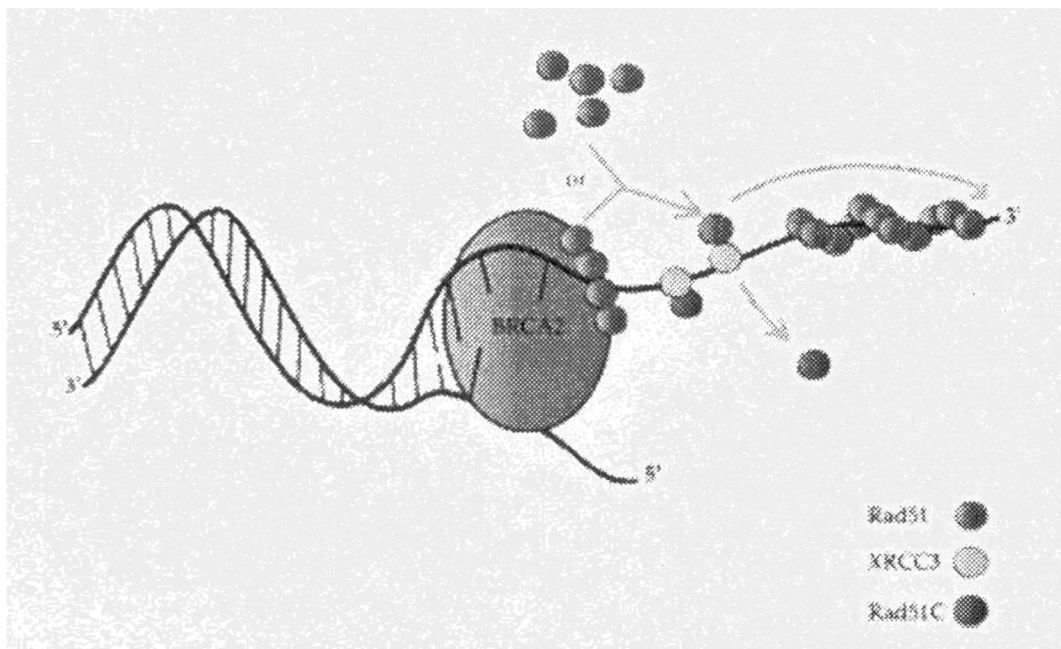


Abbildung 4: Interaktionen zwischen RAD51, XRCC3 und RAD51C (nach Forget et al., 2004)

Der RAD51C/XRCC3-Heterodimer bindet bei DNA-Doppelstrangbruch an Einzelstrang-DNA. Durch direkte Interaktion zwischen XRCC3 und RAD51 wird die Bildung des RAD51-Nukleoproteinfilamentes initiiert.

1.2.5 „Non-homologous end–joining“ (NHEJ) und die Rolle von XRCC4

Im Gegensatz zum homologen Rekombinationsreparaturweg (HR) erfolgt die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) im NHEJ-Reparaturweg mit einer Veränderung der genetischen Information, da hierbei dem Namen entsprechend ein Reparaturvorgang zwischen zwei nicht-homologen DNA-Sequenzen erfolgt. Aus diesem Grund wird der NHEJ-Reparaturweg auch als illegitim oder unpräzise bezeichnet. Dennoch werden die meisten DNA-Doppelstrangbrüche auf diesem Wege repariert. Es konnten bislang mindestens sieben Proteine identifiziert werden, die an diesem Prozess beteiligt sind (Ku70/80, DNA-PKcs, ARTEMIS, LIGASE IV, XRCC4, XLF). Abbildung 5 veranschaulicht ein Modell für die Interaktion dieser Proteine innerhalb des NHEJ (Lieber et al., 2003). Abbildung 6 veranschaulicht die Interaktion der Proteine Ku70/80, DNA-PKcs und ARTEMIS nach den Erkenntnissen von Drouet et al. (2006).

Es konnte gezeigt werden, dass bei DNA-Doppelstrangbruch ARTEMIS zusammen mit XRCC4/LIGASE IV und DNA-PK aus dem Zytoplasma in den Zellkern mobilisiert werden (Drouet et al., 2005). In einem ersten Schritt muss die DNA-Doppelstrangbruchregion erkannt und die beiden DNA-Enden beieinander gehalten werden („recognition and synapsis“). An diesem Schritt scheint der Proteinkomplex Ku beteiligt zu sein. Ku ist ein Heterodimer und setzt sich aus zwei funktionellen Untereinheiten, Ku70 und Ku80, zusammen. Innerhalb der Struktur des Ku-Proteinkomplexes existiert eine kreisförmige Lücke, über die der Kontakt mit der DNA-Helix zustande kommt und somit möglicherweise der NHEJ-Reparaturweg ausgelöst wird (Walker et al., 2001). Durch den Kontakt mit der DNA-Helix kommt es zu einer Konformationsänderung des Ku-Dimers, so dass eine Bindung von DNA-PKcs (katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase) an die Ku80-Untereinheit erfolgen kann. Wie gezeigt werden konnte fungiert der Carboxy-Terminus der Ku80-Untereinheit als Andockstelle (Falck et al., 2005). Für Ku und DNA-PKcs konnte eine Synapsis-Aktivität nachgewiesen werden (DeFazio et al., 2002). Synapsis-Aktivität bezeichnet die Fähigkeit, beide DNA-Enden in der DSB-Region dicht beieinander zu halten. DNA-PKcs ist auch unabhängig von Ku in der Lage an ein dsDNA-Ende zu binden. Die Affinität zur Bindung kann jedoch in Anwesenheit von Ku auf das 100-fache gesteigert werden (Hammersten et al., 1998). Als zweiten Schritt innerhalb des NHEJ wird ein „end-processing“ angenommen, in dem inkompatible DNA-Enden durch eine Nuklease verkürzt werden. Bevorzugt werden solche DNA-Abschnitte miteinander verbunden, die sogenannte Mikrohomologien zeigen, d.h. in denen die Sequenz in bis zu vier Nukleotiden übereinstimmt (Roth et al., 1986). Die überschüssigen Nukleotide werden dann mit einer 5'- oder 3'-

Nuklease entfernt. DNA-PKcs besitzt sowohl 5'- als auch 3'-Nuklease-Aktivität in Komplexbildung mit dem Protein ARTEMIS (Ma et al., 2002). ARTEMIS wurde als defiziente Komponente bei Kindern mit dem strahlensensiblen SCID-Syndrom („severe combined immunodeficiency“) identifiziert (Moshou et al., 2001). Die Phosphorylierung von ARTEMIS durch DNA-PKcs wird als Startpunkt für die Nukleaseaktivität des Komplexes angesehen (Ma et al., 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass DNA-PKcs essenziell ist um ARTEMIS auf das beschädigte Chromatid zu laden, welches den DNA-PKcs/ARTEMIS-Komplex zu einem Kernstück des NHEJ-Reparaturweges macht (Drouet et al., 2006). Drouet et al. (2006) postulierten, dass die DNA-PKcs vermittelte Phosphorylierung sowohl für die Aktivierung der Nukleaseaktivität von ARTEMIS, als auch für die Stabilisierung des DNA-PKcs/ARTEMIS-Komplex notwendig ist. Unter diesen Bedingungen kann ARTEMIS seine Endonuklease-Aktivität entfalten.

Das Protein Ku scheint neben der oben beschriebenen Bindungsaktivität ebenfalls für die Dissoziation des DNA-PKcs/ARTEMIS-Komplexes von der DNA-Doppelstrangbruchregion verantwortlich zu sein. Bindung und Dissoziation könnten in einer Art Konkurrenz zueinander stehen. Eine andere Theorie ist, dass die Dissoziation von ARTEMIS und DNA-PKcs durch eine Konformationsänderung von DNA-PK ausgelöst wird. Die Beteiligung eines weiteren unbekanntes Proteins konnte bislang noch nicht ausgeschlossen werden (Drouet et al., 2006).

Die Frage, ob im Anschluss an das durch ARTEMIS und DNA-PKcs vermittelte „end-processing“ eine Neusynthese („gap-filling“) der dsDNA innerhalb der Lücke erfolgt, ist noch unzureichend geklärt. Die Ligation der dsDNA-Enden wurde bislang als Funktion des XRCC4/Ligase IV-Komplex beschrieben (Grawunder et al., 1997). Ahnesorg et al. (2006) berichten über die Identifizierung eines neuen Reparaturproteins, XLF, welches strukturelle Ähnlichkeit zu XRCC4 besitzt und mit dem XRCC4/LIGASE IV-Komplex interagiert. Zellen mit geringer XLF-Aktivität zeigen eine erhöhte Sensibilität bezüglich ionisierender Strahlung und Defekte in der DSB-Reparatur. Der XRCC4/LIGASE IV-Proteinkomplex scheint zum Teil an XLF gebunden vorzuliegen. Lee et al. (2000) beschreiben den XRCC4/LIGASE IV-Proteinkomplexes als eine Tetramer-Struktur, welche sich jeweils aus einem XRCC4- und einem LIGASE IV-Dimer zusammensetzt. Es wurde vermutet, dass der XRCC4-Dimer den strukturellen Kern dieses Tetramers darstellt und diesen stabilisiert. Konform mit dieser Vermutung zeigten Grawunder et al. (1997), dass XRCC4 die Ligaseaktivität von LIGASE IV zu stabilisieren und zu erhöhen scheint. In einer Studie von Modesti et al. (2003) wurde ferner beschrieben, dass XRCC4 neben seiner dimeren Form ebenfalls in Form eines Tetramers

vorliegen kann. Man nahm an, dass nur die dimere Form des XRCC4-Proteins Bindungsaktivität an LIGASE IV und somit NHEJ-Funktionalität besitzt. Ahnesorg et al. (2006) mutmaßen eine Regulationsfunktion des XLF-Proteins in Bezug auf die Konformationsänderung von XRCC4. Diesbezüglich bedarf es weiterer struktureller Analysen um die Zusammenhänge des XRCC4/LIGASE IV/XLF-Komplexes zu untersuchen. Im Zusammenhang mit der bereits oben erwähnten Frage nach einem „gap-filling“ konnte gezeigt werden, dass die DNA-Polymerase μ mit dem XRCC4/LIGASE IV-Komplex interagiert (Mahajan et al., 2002). Ob und welche zusätzliche Funktion der DNA-Polymerase μ obliegt ist noch nicht abschließend geklärt.

Das XRCC4-Protein ist mit 334 Aminosäuren ein relativ kleines Protein. Seine Größe wird auf ca. 38 kDa geschätzt. In der SDS-PAGE-Gelelektrophorese zeigt die prominente Form von XRCC4 jedoch das Laufverhalten eines ca. 55 kDa großen Proteins. Als Ursache dieses Laufverhaltens wird der hohe Anteil an Aminosäureresten in der Proteinstruktur angenommen, welcher die Menge des am Protein gebundenen SDS reduzieren könnte (Critchlow et al., 1997). Nach Einwirkung von ionisierender Strahlung wird XRCC4 vorwiegend in einer p60-Form in der SDS-PAGE detektiert. p60 wurde als von DNA-PKcs phosphorylierte Form von XRCC4 identifiziert, da sie in DNA-PKcs defizienten Zelllinien nicht nachweisbar und darüber hinaus auf Phosphatase sensibel war (Matsumoto et al., 2000). Lee et al. (2004) und Yu et al. (2003) belegen, dass die von DNA-PKcs abhängige XRCC4-Phosphorylierung vor allem an den Serinresten 260 und 318 erfolgt. Des Weiteren existieren sieben weitere Phosphorylierungsstellen (Serine 193, 259, 302, 313, 325, 326 und Threonin 321) des XRCC4-Proteins. Diesen wird jedoch nur eine untergeordnete Rolle eingeräumt.

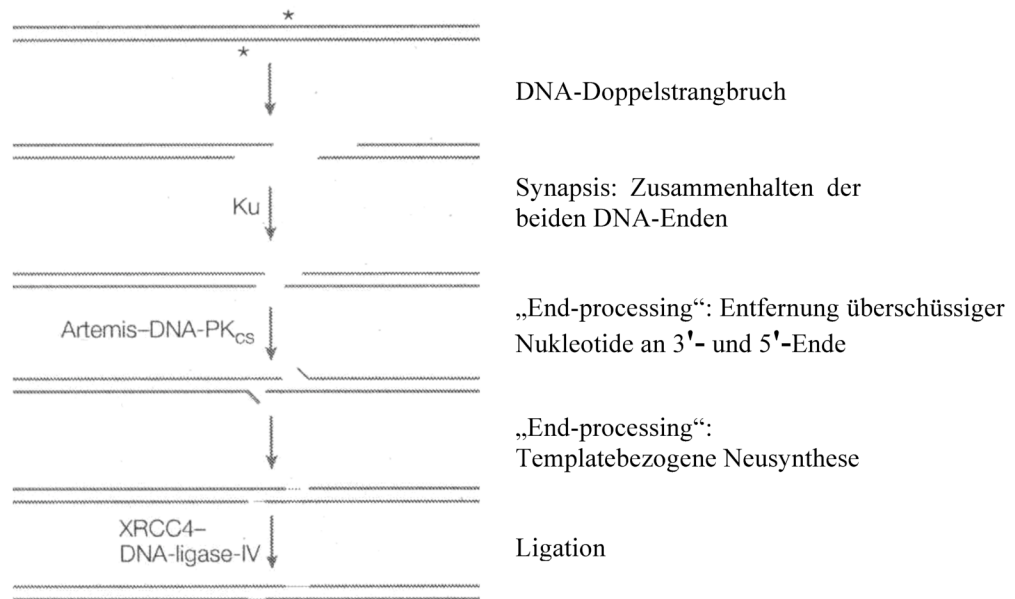


Abbildung 5: „Non-homologous DNA end-joining“ (NHEJ) Signalweg (nach Lieber et al., 2003)

Wenn ein DNA-Doppelstrangbruch auftritt, werden während der initialen Synapsis die DNA-Enden mit Hilfe von Ku und DNA-PKcs beieinander gehalten. Während des „end-processing“ werden überschüssige Nukleotide an 3'- und 5'-Ende durch die Nuklease-Eigenschaft von ARTEMIS und DNA-PKcs entfernt. Im Anschluss werden entstandene Lücken („gaps“) durch Neusynthese aufgefüllt. Der XRCC4/Ligase IV-Komplex katalysiert schließlich die Ligation der DNA-Enden.

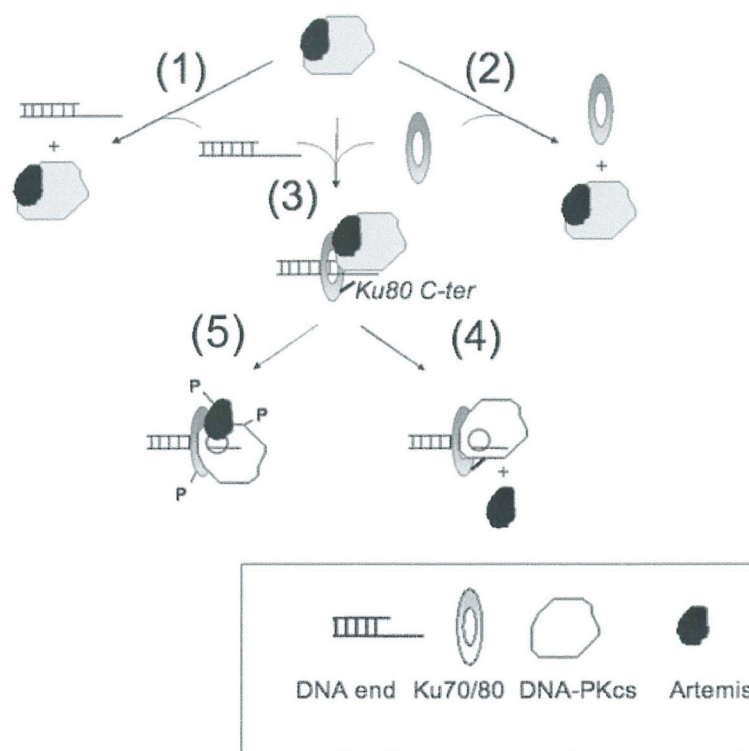


Abbildung 6: Modell für die Interaktion zwischen DNA-PKcs und ARTEMIS in Anwesenheit der DNA-Doppelstrangbruchregion (nach Drouet et al., 2006)

Im Modell wird nur ein DNA-Ende der Doppelstrangbruchregion gezeigt. (1) Im zellulären Milieu kann der DNA-PKcs-ARTEMIS-Komplex nur in Anwesenheit von Ku an DNA-Enden binden. (2) Ku kann nur in Anwesenheit eines DNA-Endes an den DNA-PKcs-ARTEMIS-Komplex binden. (3) Die Bindung von Ku an das DNA-Ende exponiert den Carboxy-Terminus des Proteins als eine Andockstelle für den DNA-PKcs/ARTEMIS-Komplex. (4) Die Einschleusung von DNA-PKcs in den Ku/DNA-Komplex erzeugt eine Konformationsänderung, welche ARTEMIS, zur Verhinderung seiner Kinase-Aktivität, von dem Komplex dissoziieren lässt. (5) Unter kinaseaktiven Bedingungen führt eine weitere Konformationsänderung von DNA-PKcs, welche möglicherweise durch eine Autophosphorylierung oder die Phosphorylierung von ARTEMIS erfolgt, zur Stabilisierung des DNA-PKcs/ARTEMIS-Komplex und die Endonuklease-Aktivität von ARTEMIS wird ausgelöst.

1.2.6 ATM

Das *ATM*-Gen ist 1995 als das beim Strahlensensibilitätsyndrom Ataxia teleangiectatica (AT) mutierte Gen auf dem Chromosomenabschnitt 11q23.1 identifiziert worden (Savitsky et al., 1995a; 1995b). Es kodiert für ein Protein mit 3056 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 350 kDa. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und ist eine Multisystemerkrankung des Kindesalters. Das Krankheitsbild wurde erstmalig 1926 von den tschechischen Neurologen Syllaba und Henner als kongenitale Athetose beschrieben. 1941 beschrieb die französische Neurologin Denise Louis-Bar die Krankheit erneut,

weswegen die Ataxia teleangiectatica ebenfalls den Namen Louis-Bar-Syndrom trägt. Das Syndrom setzt sich zusammen aus einer zerebellären Ataxie, multiplen Teleangiektasien, einer ausgeprägten Immundefizienz sowie einer zellulären Strahlensensibilität und Chromosomeninstabilität. Ein weiteres klinisches Merkmal der AT ist die Disposition für bestimmte Malignome. Während Kinder vorwiegend Lymphome oder Leukämien entwickeln, leiden Patienten, die das Erwachsenenalter erreichen, auch an soliden Tumoren wie z.B. dem Mammakarzinom. Die Lebenserwartung der AT-Patienten ist mit 20-40 Jahren deutlich eingeschränkt, kann aber im Ausnahmefall 60 Jahre überschreiten. Die häufigsten Todesursachen sind die Folgen einer malignen Erkrankung sowie rezidivierende pulmonale Infektionen aufgrund der Immundefizienz.

Während die Ataxia teleangiectatica mit einer Inzidenz von ca. 1:100.000 in Deutschland eine seltene Krankheit ist, wird die Frequenz von heterozygoten Trägern einer *ATM*-Mutation in epidemiologischen Studien auf ca. 1 % geschätzt. Heterozygote Allelträger zeigen keine Symptome der AT; sie erkranken jedoch häufiger an Brustkrebs und anderen Malignomen (Swift et al., 1987; Athma et al., 1996). Das Brustkrebsrisiko für AT-Heterozygote ist gegenüber der Durchschnittsbevölkerung etwa dreifach erhöht (Athma et al., 1996; Renwick et al., 2006).

Das ATM-Protein ist vor allem kernständig lokalisiert und besitzt eine zentrale Rolle in der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche. Seine Funktion liegt in der durch Strahleneinwirkung induzierbaren Phosphorylierung von Proteinen wie BRCA1, p53, Nibrin und CHEK2 und CtIP. ATM kontrolliert darüber hinaus die Phosphorylierung von RAD51 über die Aktivierung der Proteinkinase c-Abl (Chen et al., 1999). Durch seine Proteinkinasefunktion vermittelt ATM den Zellzyklusarrest und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Kastan et al., 2000). Ein Funktionsverlust oder eine Funktionsminderung des ATM-Proteins resultiert in der Akkumulation von DNA-Doppelstrangbrüchen und chromosomaler Instabilität, welche wiederum Ausgangspunkt sein können für die Aktivierung von Protoonkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.

1.2.7 NBS1

Das *NBS1*-Gen wurde 1998 von Varon et al. identifiziert. Es ist auf dem Chromosomenabschnitt 8q21.3 lokalisiert und umfasst 16 Exons. Sein Transkript kodiert für das 754 Aminosäuren lange und ca. 95 kDa große Protein Nibrin. Eine Mutation des *NBS1*-Gens (657del5) ist Auslöser für die meisten Formen des Nijmegen Breakage Syndroms (Varon et al., 1998). Diese ebenfalls autosomal rezessiv vererbte Erkrankung zeigt auf zellulärer Ebene deutliche Überlappungen zur Ataxia teleangiectatica. Sie wurde 1981 erstmals bei zwei Brüdern mit Mikrozephalie, geistiger Retardierung, Gesichtserythemen, Hyperpigmentierung, IgA-Defizienz und chromosomaler Instabilität beschrieben (Weemaes et al., 1981). Eine besondere Disposition zu hämatopoetischen Erkrankungen wie Leukämien bei NBS-Patienten wurde von Seemanova et al. (1985) beschrieben. Nachfolgend konnte eine erhöhte Strahlensensibilität in Zellen von NBS-Patienten beobachtet werden (Taalman et al., 1989).

Nibrin wird nach Einwirkung von ionisierender Strahlung durch ATM phosphoryliert. Zellen mit ATM-Mutation weisen eine verminderte Phosphorylierung von Nibrin auf. Dieser Umstand liefert einen biochemischen Erklärungsansatz für die Ähnlichkeit der AT- und NBS-Phänotypen (Gatei et al., 2000). Nibrin bildet ferner einen Komplex mit den Proteinen RAD50 und MRE11. Dem MRE11/RAD50/NBS1-Komplex wird eine übergeordnete Rolle in beiden Reparaturwegen (HR und NHEJ) von DNA-Doppelstrangbrüchen zugeordnet (Kastan et al., 2000). Er übt vermutlich eine frühe Sensorfunktion in der Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen aus, indem er einen ATM-abhängigen Reparaturweg aktiviert (Morales et al., 2005).

NBS ist in Westeuropa nur wenig verbreitet, jedoch in Osteuropa, vor allem in Tschechien, Russland und Polen, durchaus häufiger. NBS-Heterozygote haben ähnlich wie AT-Heterozygote ein erhöhtes Krebsrisiko. Seemanova konnte 1990 eine Häufung verschiedener Malignome unter Blutsverwandten von NBS-Patienten nachweisen. 2001 konnten Seemanova et al. dieses Ergebnis in einer weiteren Studie bestätigen. In der deutschen Bevölkerung ist die NBS-Mutation 657del5 selten (Carlomagno et al., 1999). In Osteuropa jedoch konnte eine signifikant erhöhte Prävalenz dieser Mutation bei Brustkrebspatientinnen belegt werden (Buslov et al., 2005; Górski et al., 2005; Steffen et al., 2006; Bogdanova et al., in Revision).

1.3 Das bilaterale Mammakarzinom

Vom Standpunkt der Tumorentstehung her betrachtet stellt das Auftreten von zwei unabhängigen Malignomen in einem Organsystem eine Rarität dar. Der bilaterale Brustkrebs nimmt diesbezüglich eine Sonderstellung ein. Verschiedenen Studien zufolge tritt bei 2-8 % aller Brustkrebspatientinnen ein bilaterales Mammakarzinom auf (Healey et al., 1993; Mose et al., 1995). Liegen zwischen beiden Tumorereignissen weniger als sechs Monate spricht man von einem synchronen Mammakarzinom. Tumoren, die in einem Zeitraum von mehr als sechs Monaten aufeinanderfolgen, bezeichnet man als metachrone Mammakarzinome. Das Vorkommen von synchronen Mammakarzinomen wird mit ca. 25-40 %, das der metachronen mit ca. 60-75 % aller bilateralen Fälle angegeben (Mose et al., 1995; Maculotti et al., 1996). Die Diagnose des metachronen kontralateralen Tumors wird durchschnittlich nach fünf bis sieben Jahren gestellt (Mose et al., 1995; Steinmann et al., 2001).

Die Risikofaktoren für die Entstehung eines bilateralen Mammakarzinoms ähneln grundsätzlich denen der Gesamtheit aller Mammakarzinome. Als besondere Prädispositionsfaktoren werden das junge Alter bei Erstdiagnose eines Mammakarzinoms und eine für diese Erkrankung positive Familienanamnese angenommen (Chen Y et al., 1999). Der bilateralen Brustkrebserkrankung wird, ähnlich wie bei anderen paarweise auftretenden Tumoren, eine Indikatorfunktion für das Vorliegen einer genetischen Prädisposition zugeordnet (Anderson et al., 1971; Knudson, 1971). Die Bedeutung von *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationen für die Entstehung des bilateralen Mammakarzinoms konnte in epidemiologischen Studien an Familien mit hoher Brustkrebsbelastung gezeigt werden. Heterozygotie für eine *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation prädisponiert demzufolge für die Entstehung eines kontralateralen Mammakarzinoms (Ford et al., 1994; Easton et al., 1995). Andere Studien konnten jedoch keine klare, sondern bestenfalls eine grenzwertig signifikante Assoziation zwischen *BRCA1/BRCA2*-Mutationen und dem bilateralen Mammakarzinom in bevölkerungsbezogenen Kollektiven nachweisen (Papelard et al., 2000; Steinmann et al., 2001). Werden hingegen andere Selektionskriterien wie z.B. ein frühes Ersterkrankungsalter zusätzlich in Betracht gezogen, erhöht sich der proportionale Anteil an *BRCA1/BRCA2*-Mutationsträgerinnen unter bilateralen Brustkrebspatientinnen (Bergthorsson et al. 2001; Steinmann et al., 2001). Die weitaus meisten bilateralen Brustkrebsfälle können jedoch nicht mit einer *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation in Verbindung gebracht werden. Auf der Suche nach weiteren genetischen Prädispositionen werden seit einiger Zeit auch Polymorphismen in Genen mit niedriger Penetranz eine Rolle in der Entstehung sowohl des unilateralen als auch des bilateralen

Mammakarzinoms eingeräumt. Imyanitov et al. (2003) messen epidemiologischen Fall-Kontroll-Studien bei Patientinnen mit bilateralem Mammakarzinom bezüglich der Assoziation zu genetischen Polymorphismen eine besondere Aussagekraft bei, da sie in dieser Gruppe verglichen mit unilateral betroffenen Patientinnen eher eine Akkumulation der betreffenden Genvarianten vermuten. Easton und Antoniou et al. (2004) schätzen, dass Kollektive mit bilateral betroffenen Patientinnen ähnlich wie solche mit hoher familiärer Häufung des Mammakarzinoms die statistische Power einer Fall-Kontroll-Studie etwa vierfach erhöhen. Die vorliegende Arbeit hat diesen Gedankengang aufgegriffen. Der nachfolgende Abschnitt soll auf die Zielsetzung dieser Arbeit näher eingehen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation sollte zunächst die Prävalenz häufiger Genvarianten der DNA-Reparaturgene *RAD51*, *XRCC2* und *XRCC3* in Kollektiven von Patientinnen mit bilateralem Mammakarzinom und unilateralem Mammakarzinom sowie in der Durchschnittsbevölkerung vergleichend molekulargenetisch untersucht werden. Es wurden drei bekannte Varianten in diesen Genen der homologen Rekombinationsreparatur ausgewählt, die zuvor in mindestens einer früheren Publikation mit einer Disposition für das Mammakarzinom assoziiert worden waren. Im späteren Verlauf der Doktorarbeit sollten neue Varianten in dem, zu dem damaligen Zeitpunkt noch weitgehend unerforschten, Reparaturgen *XRCC4* identifiziert und diagnostische Testverfahren etabliert werden. Klinische Aspekte der Erkrankung sollten bei allen Trägerinnen im Vergleich zu Nichtträgerinnen der Varianten ausgewertet werden. Zusätzlich sollten von einigen Trägerinnen der *RAD51*- und *XRCC4*-Varianten lymphoblastoide Zelllinien angelegt und funktionelle Analysen auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt werden.

1.5 Vorstellung der Patientenkollektive

Für diese Arbeit stand ein Patientinnenkollektiv von 120 Frauen mit bilateralem Mammakarzinom zur Verfügung. Für diese 120 bilateral betroffenen Frauen wurde ein nach dem Alter bei Erstdiagnose des zweiten Tumors und der Familienanamnese paarweise abgeglichenes Vergleichskollektiv von unilateral betroffenen Patientinnen erstellt. Als positive Familienanamnese wurde gewertet, wenn mindestens eine Verwandte ersten oder zweiten Grades bereits an einem Mammakarzinom erkrankt war. Die Blutproben der Patientinnen beider Kollektive sowie die klinischen Daten wurden in dem Zeitraum von 1996-2002 von PD Dr. med. Michael Bremer und weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Strahlentherapie und Spezielle Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover zusammengetragen. Als weiteres Vergleichskollektiv dienten 120 Proben freiwilliger Blutspender aus der Durchschnittsbevölkerung.

Die folgende Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der klinischen Charakteristika der Patientinnen mit bilateralem und unilateralem Mammakarzinom. Die Probennummern sind in Tabelle 48 des Anhangs aufgeführt.

	Bilateral Kollektiv (n=120)		Unilateral Kollektiv (n=120)	p-Wert
Familienanamnese				
mindestens ein Mammakarzinom	33 (27,5 %)		33 (27,5 %)	1,00
negativ für Mammakarzinome	87 (72,5 %)		87 (72,5 %)	
unbekannt	1 (0,8 %)		1 (0,8 %)	
mittlere Alter Menarche	13,9		13,8	0,78
mittlere Anzahl Geburten	1,4		1,5	0,35
Manifestation MammaCa				
synchron	29 (24,2 %)			
metachron (>6 Monate)	91 (75,8 %)			
mittleres Zeitintervall (Jahre)	6,1			
	Tumor 1	Tumor 2		
med. Alter ED	54,6	60,7	59,8	0,54
Tumorstadium				
Tis	4 (3,3 %)	7 (5,8 %)	4 (3,3 %)	0,92 / 0,14
T1	63 (52,5 %)	75 (62,5 %)	68 (56,7 %)	
T2	25 (20,8 %)	32 (26,7 %)	37 (30,8 %)	
T3	6 (5,0 %)	3 (2,5 %)	6 (5,0 %)	
T4	6 (5,0 %)	3 (2,5 %)	4 (3,3 %)	
unbekannt	16 (13,3 %)	/	1 (0,8 %)	
Nodalstadium				
N0	70 (58,3 %)	89 (74,2 %)	70 (58,3 %)	0,33 / 0,24
N+	35 (29,2 %)	31 (25,8 %)	46 (38,3 %)	
unbekannt	15 (12,5 %)	/	4 (3,3 %)	
Histologie				
duktales Carcinoma in situ (DCIS)	4 (3,3%)	6 (5,0%)	3 (2,5%)	0,52 / 0,57
invasiv duktales Ca	74 (61,7%)	80 (66,7%)	86 (71,7%)	
Carcinoma lobulare in situ (CLIS)	/	1 (0,83%)	/	
invasiv lobuläres Ca	13 (10,8%)	22 (18,3%)	18 (15,0%)	
tubuläres Ca	5 (4,2 %)	2 (1,7 %)	2 (1,7 %)	
medulläres Ca	1 (0,8 %)	2 (1,7 %)	3 (2,5 %)	
muzinöses Ca	1 (0,8 %)	2 (1,7 %)	/	
anaplastisches Ca	/	1 (0,8 %)	/	
unbekannt	22 (18,3 %)	4 (3,3 %)	8 (6,7 %)	
Grading				
1	11 (9,2 %)	4 (3,3 %)	10 (8,3 %)	0,63 / 0,06
2	38 (31,7 %)	55 (45,8 %)	60 (50,0 %)	
3	34 (28,3 %)	44 (36,7 %)	34 (28,3 %)	
kein Grading	37 (30,8 %)	17 (14,2 %)	16 (13,3 %)	
Hormonrezeptorstatus				
positiv	77 (64,2 %)	102 (85,0 %)	96 (80,0 %)	0,86 / 0,44
negativ	15 (12,5 %)	16 (13,3 %)	20 (16,7 %)	
unbekannt	28 (23,3 %)	2 (1,7 %)	4 (3,3 %)	
Operation				
brusterhaltend	78 (65,0 %)	99 (82,5 %)	100 (85,8 %)	<0,01 / 0,53
Ablatio mammae	42 (35,0 %)	21 (17,5 %)	17 (14,2 %)	
unbekannt	/	/	3 (2,5 %)	
Bestrahlung				
Mittlere Gesamtdosis	51,7 Gy	51,9 Gy	54,2 Gy	< 0,01 / < 0,01
adjuvante Chemotherapie				
ja	38 (31,7 %)	34 (28,3 %)	31 (25,8 %)	0,30 / 0,61
nein	81 (67,5 %)	84 (70,0 %)	89 (74,2 %)	
unbekannt	1 (0,8 %)	2 (1,7 %)		
adjuvante Hormontherapie				
ja	63 (52,5 %)	93 (77,5 %)	74 (61,7 %)	0,55 / < 0,01
nein	45 (37,5 %)	23 (19,2 %)	45 (37,5 %)	
unbekannt	12 (10,0 %)	4 (3,3 %)	1 (0,8 %)	
Fernmetastasierung				
ja	23 (19,7 %)		16 (13,3 %)	0,25
nein	97 (80,8 %)		101 (84,2 %)	
unbekannt	/		3 (2,5 %)	

Tabelle 1: Klinische Charakteristika nach paarweisem Abgleich der Bilateral- und Unilateral-Kollektive

Um zu prüfen, ob bei den in Tabelle 1 aufgeführten klinischen Charakteristika der Bilateral- und Unilateral-Kollektive signifikante Unterschiede vorlagen, wurde mit Ausnahme der Fragestellungen Tumorstadium und Grading der Pearson Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Tumorstadium und Grading wurden mittels linearer Assoziation („linear-by-linear-association“) geprüft.

In geringer Anzahl wurden auch Fälle von nicht invasiven Tumoren, *Carcinomata in situ* (Tis), in die Bilateral- und Unilateral-Kollektive mit einbezogen. Diesbezüglich lagen im Bilateral-Kollektiv keine Überschneidungen vor, d.h. bei insgesamt elf *Carcinomata in situ* lag in zehn Fällen mindestens ein invasives Mammakarzinom auf der kontralateralen Seite vor. In einem Fall mit histologisch nachgewiesenem nicht invasivem Zweittumor konnten bezüglich des Ersttumors keine Angaben zu dem Tumorstadium und der Histologie sowie weiterer klinischer Charakteristika gemacht werden.

Das mittlere Alter bei Menarche ($p = 0,78$) sowie die mittlere Anzahl an Lebendgeburten ($p = 0,35$) unterschieden sich nicht signifikant bei beiden Kollektiven. Da die Kollektive nach der Familienanamnese (FA) und dem Alter bei Auftreten der Zweiterkrankung der bilateral betroffenen Patientinnen sowie dem Alter bei Erstdiagnose der unilateral betroffenen Patientinnen abgeglichen wurden, gab es auch diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede (FA: $p = 1,00$; Alter: $p = 0,54$). Für das Tumorstadium, den Lymphknotenstatus, die Histologie, das Grading, den Hormonrezeptorstatus und das Durchführen einer adjuvanten Chemotherapie wurde jeweils die Erst- bzw. Zweiterkrankung der bilateral betroffenen Patientinnen mit derjenigen der unilateral betroffenen Patientinnen verglichen. Auch hier lagen keine signifikanten Unterschiede vor (p -Werte siehe Tabelle 1). Allerdings lieferte der Vergleich des Gradings zwischen dem Zweittumor der bilateralen und dem Tumor der unilateralen Mammakarzinompatientinnen einen Trend ($p = 0,06$) mit einer Tendenz zu einem höheren Grading beim bilateralen Mammakarzinom. Ein signifikanter Unterschied ergab sich bei dem Vergleich der durchgeführten Operationsmethoden des Ersttumors der bilateral betroffenen Patientinnen verglichen mit dem Tumor der unilateral betroffenen Mammakarzinompatientinnen ($p = <0,01$). Beim Ersttumor wurden die bilateral betroffenen Mammakarzinompatientinnen häufiger mastektomiert. Bei Betrachtung der angewandten Operationsmethode beim Zweittumor der bilateral betroffenen Patientinnen im Vergleich zu der unilateral betroffener Patientinnen lag jedoch kein signifikanter Unterschied mehr vor. Diese Tatsache ist möglicherweise durch den Wandel der Standardoperationsmethode im Laufe der Jahre zu erklären. Die mittlere Bestrahlungsdosis variierte hingegen bei beiden Kollektiven, sowohl im Vergleich des Ersttumors als auch im Vergleich des Zweittumors der

bilateral betroffenen Patientinnen mit den unilateral betroffenen Patientinnen ($p = <0,01$; $p = <0,01$): Die Frauen mit unilateralem Mammakarzinom wurden im Mittel mit etwas höheren Dosen bestrahlt. Eine Hormontherapie wurde nur bei Auftreten des Zweittumors bilateral betroffener Patientinnen signifikant häufiger durchgeführt ($p = <0,01$) als bei unilateral betroffenen Frauen, beim Ersttumor war diese Häufung nicht nachweisbar ($p = 0,55$). Bezüglich der Häufigkeit einer Fernmetastasierung bestand bei beiden Kollektiven kein signifikanter Unterschied ($p = 0,25$).

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Acrylamid, 40 %	Biorad-Laboratories, München
Agarose	Gibco-BRL, Eggenstein
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad-Laboratories, München
Bayol F	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid, 2 %	Biorad-Laboratories, München
Borsäure	Gibco-BRL, Eggenstein
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ethanol, 99,9 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin, abs.	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchloridhexahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	hauseigene Apotheke
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
NuSieve-Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	ICN Biomedicals, Eschwege
Polyethylenglykol 8000	USB, Cleveland, USA
SDS	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Seakem-Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
TEMED	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Tris	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

2.1.2 Enzyme und biologische Substanzen

Desoxyribonukleosidtriphosphate	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hot-Start-DNA-Polymerase und Zubehör	Qiagen, Hilden
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Oligonukleotide als Primer für PCR	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	ICN Biomedicals, Eschwege
Restriktionsenzyme und Zubehör	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase und Zubehör	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.2.1 Antikörper

mAK Maus-anti-human RAD51 (α -1G8)	persönliche Sendung durch Prof. Dr. biol. hum. Stürzbecher, Universitätsklinikum Lübeck
pAK Kaninchen-anti-human XRCC4 (AHP387)	Serotec, Düsseldorf
mAK Maus-anti-human β -Actin	Klon AC-15, Sigma, St.Louis, USA
pAK Schaf-anti-Maus IgG-HRP konjugiert	Sigma, St. Louis, USA
pAK Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP konjugiert	Sigma, St. Louis, USA

2.1.2.2 DNA-Marker

1 kb-Leiter	Gibco-BRL, Eggenstein
-------------	-----------------------

2.1.2.3 Protein-Marker

Protein Marker Broad Range (6,5-175 kDa)	New England Biolabs, Schwalbach
See Blue Plus2 Pre-Stained Protein Standard (4-250 kDa)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2.4 Zellkulturmedien und Zubehör

Cyclosporin A	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ficoll-Paque Plus	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Foetales Kälberserum (FKS)	Seromed (Biochrom), Berlin
Penicillin-Streptomycin (500x)	Boehringer, Mannheim
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Gibco-BRL, Eggenstein
Sterilfilter (Minisart 0,20 und 0,45 µm)	Sartorius, Göttingen
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden

2.1.3 Kits und spezielle Chemikalien

ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq® DNA Polymerase, FS	Applied Biosystems, Weiterstadt
310 Genetic Analyzer Buffer with EDTA	Applied Biosystems, Weiterstadt
310 Genetic Analyzer POP-6™	Applied Biosystems, Weiterstadt
GENESCAN-500™ ROX	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneScan Analysis-Software	Applied Biosystems, Weiterstadt
Matrix Standard Set 6-FAM, JOE, NED, ROX	Applied Biosystems, Weiterstadt
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Biorad-Laboratories, München
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus Kit	NEN™ Life Science Products, Boston, USA
First Strand cDNA Synthesis Kit FPLCpure® MMLV Reverse Transkriptase, RNase/Dnase-freies BSA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pd (N)6-Primer Random Hexadesoxyribonukleotide in wässriger Lösung (0,2 µg/µl)	Applied Biosystems, Weiterstadt

2.2 Geräte

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Kapillare, 47 cm	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gelspritze	Hamilton Co., Reno, USA
Drucker	Epson Stylus Color 900, Meerbusch
Computer	Power Macintosh 7200/120, Cork, Irland
Aqua bidest-Anlage	
Millipore Direct Q™	Millipore, Eschborn
Autoklav	
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Autoradiographiekassette	Appligene, Heidelberg;
	DuPont de Nemours, Wilmington, USA
Brutschränke	Heraeus Instruments, Hanau
Digital-pH-Meter	Knick, Berlin
Elektrophoresekammern	
horizontal: Horizon 58/11.14/20.25	Gibco-BRL, Eggenstein
Elektrophoresis Power Supply	Behringwerke, Marburg;
	Whatman Biometra, Göttingen
Geldokumentation	
Kamera CU5	Polaroid, Enschede
Phoretix Grabber-Software v3.01	Biostep, Jahnsdorf
Transilluminator Bio View UV light	Biostep, Jahnsdorf
UV-Transilluminator	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Linearbeschleuniger MX-2 (6MV)	Siemens, München
Magnetrührer	IKA-Combimag RCT, Staufen
Mikrowelle	Küppersbusch, Gelsenkirchen
Mikroskop	
Invertoskop IX50	Olympus, Hamburg
Mini-Protean II Cell	Biorad-Laboratories, München
Mini Trans-Blot-Transfer Cell	Biorad-Laboratories, München
(Bio) Photometer	Eppendorf, Hamburg

Pipetten (einstellbar)	Eppendorf, Hamburg; Gilson über Abimed, Langenfeld
Schüttelapparat mit Wippbewegungen	Heidolph Instruments, Schwabach; Stuart Scientific über Dunn, Asbach
Schüttelinkubator	Jürgens, Hannover
Temperaturprozessor zur PCR	Biozym, Hess. Oldendorf
Vortex	Jürgens, Hannover; VWR International, Hannover
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Jürgens, Hannover
Werkbank Hera safe	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifugen	
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen

2.3 Filme

Polypan Nr.667 Polaroidfilme	Polaroid, Offenbach
Röntgenfilme	
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.4 Kleinmaterialien

Einmalhandschuhe	SensiCare Maxxim, Waltham, USA
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Falcon-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Kanülen	Braun, Melsungen
Kapillarspitzen	Biozym, Hess.Oldendorf
Kleenex	Kimberley-Clark, Koblenz-Rheinhofen
Membranen	
Hybond™-C extra (Nitrocellulose)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Parafilm	American National Can, Greenwich, Großbritannien
Pasteurpipetten (Polysterol)	Rudolf Brand, Wertheim
Pinzetten	Jürgens, Hannover
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht Applied Biosystems, Weiterstadt
Skalpelle	Jürgens, Hannover
Whatman Papier	Schleicher und Schüll, Dassel

2.5 Standardlösungen, -medien und Puffer

10 x TBE	0,9 M	108 g Tris-HCl
	0,9 M	54 g Borsäure
	0,02 M	7,2 g EDTA
	auf pH 8,3 einstellen, ad 1 l Aqua bidest.	
1 x TBE	100 ml 10 x TBE ad 900 ml Aqua bidest.	
10 x Carbonatpuffer	0,1 M	8,4 g NaHCO ₃
	30 mM	3,18 g Na ₂ CO ₃
	ad 1 l Aqua bidest.	
10 x GTS	1,9 M	144 g Glycin
	0,25 M	30 g Tris
	1 %	10 g SDS
	ad 1 l Aqua bidest.	
10 x PBS	1,4 M	80 g NaCl
	27 mM	2 g KCl
	90 mM	14,4 g Na ₂ HPO ₄
	15 mM	2,4 g KH ₂ PO ₄
	auf pH 7,4 einstellen, ad 1 l Aqua bidest.	

1 x PBS	100 ml 10 x PBS	
	ad 1 l Aqua bidest.	
10 x Puffer <i>Taq</i> -Polymerase	250 mM	HCl (pH 9,3; 25 °C)
	10 mM	2-Mercaptoethanol
	500 mM	KCl
Lambda-Protein-Phosphatase-Puffer	50 mM	Tris-HCl
	0,1 mM	Na ₂ EDTA
	5 mM	DTT
	0,01 %	Brij 35
	pH 7,5 bei 25 °C	
Zellkulturmedium für lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten (pro Flasche):		
RPMI-Medium 1640	500ml	
Penicillin	50.000 U	
Streptomycin	50 mg	
Foetales Kälberserum	10-20 % (v/v)	

3 Methoden

3.1 Extraktion von Nukleinsäuren

3.1.1 DNA-Isolierung aus Vollblut

3.1.1.1 Methode

In einem 15 ml Falcongefäß wurden 3-5 ml EDTA-Vollblut und Lysepuffer im Verhältnis 1:2 gemischt und für ca. 30 min unter mehrmaligem Schütteln auf Eis inkubiert. Durch Zugabe des Lysepuffers entsteht ein osmotischer Gradient zwischen dem hypotonen Plasma und dem hypertonen Intrazellularraum der Erythrozyten. Aus diesem Grund kommt es zum Wassereinstrom in die Erythrozyten und somit zur Hämolyse. Nach der Inkubationszeit wurden die Falcongefäße für 15 min bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Hierbei sedimentieren die Leukozyten zu Boden und werden als kleines weißes Pellet sichtbar. Der Überstand konnte daraufhin dekantiert und verworfen werden. Durch mehrmaliges Mischen der Leukozyten mit dem Lysepuffer und Zentrifugation erfolgte die weitere Reinigung unter Überführung in Eppendorf-Reaktionsgefäße. Zu dem Leukozyten-Pellet wurde ca. 400 µl Proteinase-K-Lösung dazugegeben. Die Proteolyse erfolgte bei 56 °C über Nacht in einem speziellen Schüttelinkubator. Am nächsten Morgen wurde die DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Methode durchgeführt. Hierfür wurden ca. 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol zu dem Proteinase-K-Ansatz unter dem Abzug in die Eppendorfgefäße pipettiert und gemischt. Anschließend wurde für ca. 10 min auf Eis inkubiert und danach für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA befindet sich dann im transparenten Überstand und wurde vorsichtig in ein anderes Eppendorfgefäß überführt. Zum weiteren Reinigen der DNA wurden die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 100 % Ethanol unter vorsichtigem Schwenken gefällt. Nach 10 min Inkubation im Eisbad und 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm liegt die DNA in Form eines kleinen Pellets am Boden des Eppendorfgefäßes. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Die DNA wurde nun insgesamt dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen. So wird sie weitgehend entwässert. Beim letzten Waschschriff wurde der Restalkohol vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Anschließend wurde das Pellet im offenen Probengefäß bei 37 °C für ca. 10 min im Heizblock getrocknet. Je nach abgeschätzter Menge der ausgefallenen DNA wurden 90, 180, 270, 360 oder 450 µl Aqua bidest. zugegeben, in welchem sich die DNA während

der Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur löst. Am nächsten Tag wurde sie dann mit 10 x TE-Puffer auf eine Endkonzentration von 1 x TE eingestellt. Zuletzt wurde die DNA-Konzentration am Photometer bestimmt.

3.1.1.2 Lösungen und Proteolyseansatz zur DNA-Isolierung

In den folgenden Tabellen sind die zur DNA-Isolierung verwendeten Lösungen und der Proteolyseansatz mit Proteinase K aufgeführt.

8,29 g	NH ₄ Cl
1,00 g	KHCO ₃
0,04 g	Na ₂ EDTA
auf pH 7,5 einstellen, ad 1 l Aqua bidest.	

Tabelle 2: Lysepuffer zur DNA-Isolierung

0,5 M	Tris-HCl
1 M	NaCl
0,01 M	Na ₂ EDTA
auf pH 7,5 einstellen, ad 1 l Aqua bidest.	

Tabelle 3: 10 x STE-Puffer für Proteinase K

190 µl	H ₂ O
40 µl	10 x STE-Puffer
20 µl	10 % SDS
150 µl	Proteinase K (10 mg/ml)

Tabelle 4: Proteinase K-Ansatz

Phenol	:	Chloroform	:	Isoamyl-Alkohol
25	:	24	:	1

Tabelle 5: Phenol-Chloroform-Isoamyl-Gemisch

0,1 M	Tris-HCl
0,01 M	Na ₂ EDTA
auf pH 8,0 einstellen, ad 1 l Aqua bidest.	

Tabelle 6: 10 x TE-Puffer

3.1.2 RNA-Isolierung aus lymphoblastoider Zellkultur

3.1.2.1 Methode

Die RNA-Isolierung wurde entsprechend der Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt.

Aufgrund ihrer spezifischen chemischen Struktur ist die RNA in hohem Maße empfindlich gegenüber einer durch RNase katalysierten Hydrolyse. Aus diesem Grund wurden nur mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelte Materialien für die Extraktion verwendet. DEPC inhibiert die RNase-katalysierte Hydrolyse durch Ethylierung von Aminogruppen. Die Reagenzien und das Kleinmaterial wurden über 12 h mit 0,1 % DEPC unter dem Abzug inkubiert und anschließend autoklaviert. Alle Arbeitsschritte wurden aufgrund der hohen Instabilität der RNA zügig unter der sterilen Bank durchgeführt.

Es wurden ca. 5-10 ml Zellsuspension aus der angelegten Zellkultur in ein 15 ml Falcongefäß überführt und bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden, das Zellpellet wurde im Eisbad gelagert. Im Anschluss wurde das Zellpellet mit 500µl BSS zum Waschen resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt, bei 4 °C und 13000 rpm für einige Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Vor einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden 100 µl BSS und 400 µl GTC/MeSH dazugegeben und mit der Pipette vorsichtig gemischt. Guanidiniumthiocyanat (GTC) zerstört in dieser Zeit die Zellmembranen und Mercaptoethanol (MeSH) spaltet Disulfidbrücken. Danach erfolgte das Ausschütteln der RNA im 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol Gemisch. Vorher wurde zur Pufferung des sauren Phenols 50 µl Natriumacetat in das Eppendorfgefäß pipettiert und so der pH-Wert auf ca. 4,4 eingestellt. Anschließend wurde für 10 min inkubiert und bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Das Phenol-Chloroform bewirkt so eine Phasentrennung, bei der die RNA in der wässrigen Phase und Proteinreste sowie andere lösliche Substanzen in der phenolischen Phase vorliegen. Das Chloroform stabilisiert die Phasengrenze. Die wässrige Phase wurde in ein neues Probengefäß überführt und mit 1:1 Vol. 100 % Isopropanol sachte von Hand hin und her geschwenkt, bis sich die Phasen durchmischten. Während der Inkubationszeit von ca. 10 min wurde die RNA gefällt. Im Anschluss wurde bei 4 °C und

13000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand mit der Pipette abgenommen und verworfen. In zwei aufeinander folgenden Waschschrritten wurde das RNA-Pellet mit 500 µl 75 % Ethanol aufgereinigt. Entsprechend der Größe des Pellets wurden 20-50 µl mit DEPC behandeltes Wasser zum Lösen dazugegeben und erneut für einige Minuten auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein 2 % Agarosegel mit jeweils 2 µl RNA-Lösung und 2 µl Auftragpuffer geladen. Bei erfolgreicher Extraktion waren nach elektrophoretischer Trennung die für ribosomale RNA spezifischen 16S und 28S Banden sichtbar.

3.1.2.2 Lösungen und Puffer

Nachfolgend werden die zur RNA-Isolierung angewendeten Lösungs- und Pufferansätze in Tabellen dargestellt.

Lösung A	0,1 %	D-Glucose
	0,0074 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O (5 x 10 ⁻⁵ M)
	0,1992 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O (9,8 x 10 ⁻⁶ M)
	0,4026 g	KCl (5,4 x 10 ⁻³ M)
	17,565 g	Tris 0,145 M, pH 7,6
Lösung B	8,19 g	NaCl 0,14 M
Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:10 mischen		

Tabelle 7: Waschlösung BSS

14,16 g	4 M Guanidiniumthiocyanat
0,22 g	25 mM Natriumcitrat, pH 7,0
0,15 g	0,5 % Lauroylsarkosin
216 µl	0,1 M 2-Mercaptoethanol
ad 30 ml DEPC-H ₂ O	

Tabelle 8: Lysepuffer zur RNA-Isolierung

Natriumacetatlösung	3 M in DEPC-H ₂ O, pH 4,2				
Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol-Gemisch	Phenol	:	Chloroform	:	Isoamylalkohol
	5	:	1	:	0,1

Tabelle 9: Reagenzien zur RNA-Extraktion

3.1.3 PEG-Präzipitation

Vor einer Sequenzierreaktion wurden die PCR Produkte durch Fällung mit PEG-Lösung (siehe Tabelle 10) gereinigt. Dazu wurden in gleichem Volumen PCR-Produkt und PEG-Lösung (z.B. je 40 µl) in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm. Der Überstand wurde sehr vorsichtig von der gegenüberliegenden Seite des Eppendorfgefäßes mit der Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde anschließend mit 100 µl 100 % Ethanol gewaschen und nochmals für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde der Ethanol vollständig mit der Pipette entfernt und das Pellet für ca. 5 min bei 50 °C im Heizblock getrocknet.

Je nach Stärke des Produkts in der initial durchgeführten Gelelektrophorese wurde das Pellet mit 10-30 µl HPLC-H₂O resuspendiert. Zur Kontrolle wurden die gereinigten PCR-Produkte dann erneut gelelektrophoretisch getrennt, um sicherzustellen, dass ausreichend Produkt für die nachfolgende Sequenzierung verblieben war.

262 g	Polyethylenglykol 8000
1,2 g	Magnesiumchloridhexahydrat
4,2 g	Natriumacetat
ad 1 l Aqua bidest.	

Tabelle 10: PEG-Lösung

3.2 Polymerase-Kettenreaktion

3.2.1 Über das Verfahren

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) wurde 1986 von Kary Mullis et al. erstmals beschrieben und hat seitdem die Molekulargenetik revolutioniert. Durch die exponentielle Vervielfältigung (Amplifikation) einer spezifischen Vorlagesequenz (Template) ist sie Ausgangspunkt für viele weitere molekularbiologische Untersuchungen.

Bei der PCR wird enzymatisch mittels der thermostabilen *Taq*-Polymerase, aus dem hyperthermophilen Archaeum *Thermus aquaticus*, *in vitro* DNA vervielfältigt. Die PCR ist heutzutage ein automatisiertes Verfahren. Mit Hilfe eines Temperaturprozessors werden nacheinander bestimmte Temperaturzyklen wiederholt, welche die Denaturierung, Primeranlagerung („annealing“) sowie die Primerverlängerung (Elongation) ermöglichen. Der Reaktionsansatz besteht aus der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz, den ca. 20 Nukleotide langen und zu den Enden der zu amplifizierenden Zielsequenz komplementären Oligonukleotidprimern, der thermostabilen *Taq*-Polymerase, den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), einem speziellen Puffer, der die Aktivität der Polymerase optimiert, sowie zweiwertigen Magnesium-Ionen, welche zur Stabilisierung der negativen Ladung der DNA und dNTPs dienen.

Im ersten Schritt der PCR wird die als Doppelstrang vorliegende Sequenz durch fünfminütiges Erhitzen auf 94 °C denaturiert und in zwei Einzelstränge getrennt. An die nun einzelsträngige Matrizen-DNA können sich bei Absenken auf die, vorher durch eine Optimierung ermittelte, spezifische Annealing-Temperatur die Oligonukleotidprimer anlagern. Diese binden an ihren jeweiligen komplementären DNA-Strang, mit dem 3'-Ende in Syntheserichtung. Die Annealing-Temperatur liegt für die meisten Primerpaare zwischen 48 und 65 °C und die benötigte Annealing-Zeit beträgt ca. 1 min. Anschließend wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, da bei dieser Temperatur die *Taq*-Polymerase ihre höchste Aktivität aufweist. Es folgt nun die Synthese des Tochterstranges ausgehend von der 3'-Hydroxylgruppe der Primer. Hierfür benötigt die *Taq*-Polymerase die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), welche sie komplementär zum Matrizen-Strang aneinanderreicht. Die hierfür benötigte Zeit liegt abhängig von der Länge der Vorlagesequenz zwischen 1-5 min. Jeder Zyklus endet mit einer abschließenden einminütigen Denaturierung. Hier werden alle vorhandenen Doppelstränge aufgetrennt und werden so ihrerseits zu Matrizen im nächsten Zyklus. Durch 20-40 Wiederholungen (n) lässt sich die gewünschte

DNA-Sequenz exponentiell auf annähernd 2^n vervielfältigen. Am Ende der PCR folgt eine fünfminütige Elongationsphase, in der noch unvollständig duplizierte Stränge vervollständigt werden sollten. Nach Beendigung der PCR sollten die Reaktionsgefäße mit der amplifizierten DNA gekühlt aufbewahrt werden. Für eine PCR sollten nur autoklavierte Agenzien und Werkzeuge benutzt werden, ebenso ist auf sauberes Pipettieren zu achten, da bereits kleinste Mengen an DNA amplifiziert werden. Aus diesem Grund muss bei jeder PCR ein Leerwert mitgeführt werden, um mögliche Verunreinigungen der Agenzien auszuschließen. Beim Pipettieren ist darauf zu achten, dass die *Taq*-Polymerase als letztes zugegeben wird, da sie sowohl temperatur- als auch magnesiumempfindlich ist und möglicherweise an Aktivität verliert. Um einen Siedeverzug oder ein Verdampfen der kleinen Reaktionsansätze zu vermeiden, haben neuere Temperaturprozessoren einen heizbaren Deckel, so dass auf ein Überschichten der Ansätze mit Mineralöl verzichtet werden kann.

3.2.2 Verwendete Programme, Reaktionsansätze und Primer

Anhand der folgenden Tabellen sollen in diesem Abschnitt die Reaktionsbedingungen und –ansätze sowie die verwendeten Primer zur PCR näher beschrieben werden. Tabelle 11 zeigt den Standardprogrammablauf eines Temperaturprozessors zur PCR. Tabelle 12 zeigt eine Liste der Reaktionsansätze unterschiedlicher Volumina. Tabelle 13 dokumentiert die veränderten Reaktionsbedingungen bei Verwendung einer „Hot-Start“-*Taq*-Polymerase. Tabelle 14 stellt die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer dar.

Programmablauf			Zeitdauer	Temperatur	Zyklen
1.	Vordenaturierung		5 min	94 °C	1
2.	Amplifizierung	„Annealing“	1 min	Primerspezifische Temperatur	34 Ausnahme: RAD51: 32
		„Elongation“	1 min	72 °C	
		Denaturierung	1 min	94 °C	
3.	Finale „Elongation“		5 min	72 °C	1
4.	Kühlzyklus			10 °C	

Tabelle 11: Standardprogrammablauf zur PCR

Ansatz	A	B	C	D
Volumen, gesamt (ca.)	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl
HPLC-H ₂ O	6 µl	9 µl	12 µl	15µl
10 x Puffer	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl
Primer A (5 µM)	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl
Primer B (5 µM)	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl	1,8 µl	2,4 µl	3 µl
dNTPs (2 mM)	1,2 µl	1,8 µl	2,4 µl	3 µl
Q-Solution	4 µl	6 µl	8 µl	10 µl
DNA	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl	0,3 µl	0,4 µl	0,5 µl

Tabelle 12: Verwendete PCR-Ansätze

„Hot-Start“-Taq-Polymerase	
Volumen	50 % des Volumens an Taq-Polymerase
10 x Puffer	speziell für Hot-Start-Taq-Polymerase
Vordenaturierungszeit	auf 15 min verlängert

Tabelle 13: Veränderte Reaktionsbedingungen bei Anwendung der „Hot-Start“-Taq-Polymerase

Gen	Exon	„Forward primer“ 5'-3'-Richtung	„Reverse primer“ 3'-5'-Richtung	Primer- paar	Annealing- temperatur
RAD51	1(5'UTR)	TGGGAAGTCAACTCATCTGGG	GCGCTCCTCTCTCCAGCAG	AF/RR	63 °C
	1(5'UTR)	TGGGAAGTCAACTCATCTGGG	GGGCCAAAGCTTTCTTCTTCCACTG	AF/2	59 °C
XRCC2	2	CAGCACGATGTATACTTCCC	AAACTTTTGGCCACGAGCAG	2F/2R	63 °C
XRCC3	7	GCTGACCAGCATAGACAATGAC	ATCCTGGCTAAAATACGAGCTC	7F/7R	63 °C
XRCC4	2	GTAGCTGAGAGGCCAGTACAG	CCCTGAGGACTGAAGAATAGC	2F/2R	59 °C
	3	GTGTAGTATAGGGATTGATTTTAC	GAGGTGTTCTGGGAATAATACAG	3FF/3RR	59 °C
	4	GTGTATGCTTAAAACCAGGC	ATGTGCTAATCCACATATATTGG	4F/4R	59 °C
	4	GTGTATGCTTAAAACCAGGC	CGTCCTTGAACATCATTCCAATC	4F/4RR	59 °C
	5	GAAATCTTCTTGATTATTAGGCTG	GAACATCCACATCCAGACTACC	5F/5R	59 °C
	6	CTGATAAATCTGCTGCCTAGC	CCCAAATAAGATATTCAACAGAGG	6F/6R	59 °C
	7	CCTTATGTCAATGCTAAAAACAGC	GTCATCTCACTTCTTGGCAAAG	7F/7R	59 °C
	8	CTGTCAATTCATCTATGTGTCTC	GAAAACATAGTCTAGTGAACATC	8F/8R	59 °C
	7-8	CTTGATGTCAGTATATTGCACC	GAAAACATAGTCTAGTGAACATC	7FF/8R	59 °C

Tabelle 14: PCR-Primer zur Amplifikation, Sequenzierreaktion und Fragmentlängenanalyse

3.3 Reverse Transkription

Das enzymatisch katalysierte Umschreiben der genetischen Information von RNA in cDNA wird als reverse Transkription bezeichnet, da es sich im Vergleich zu der Mehrzahl der zellulären Transkriptionsvorgänge um eine genetische Informationsumschreibung in umgekehrte Richtung handelt. Anschließend können die Amplifikation der cDNA mittels PCR sowie weitere molekularbiologische Untersuchungen wie die Fragmentlängenanalyse, die Sequenzierung oder eine restriktionsenzymatische Spaltung durchgeführt werden.

Reverse Transkriptasen kommen *in vivo* bei Retroviren vor. Diese benötigen Enzyme zur Amplifikation des viralen Genoms. Im von mir verwendeten „First Strand cDNA Synthesis Kit“ wurde die Reaktion durch die Reverse Transkriptase des *Moloney murinen Leukämie Virus* (MMLV) katalysiert. Des Weiteren wurden Hexamer (N)₆-Primer, ein Gemisch aus Hexanukleotiden unterschiedlicher Sequenz, verwendet, welche die Synthese von unterschiedlich langen cDNA-Sequenzen des gesamten RNA-Bereichs ermöglichen. Wie bei der RNA-Isolierung wurden nur mit DEPC behandelte Materialien verwendet. Zusätzlich wurde DTT-Lösung (Dithiothreitol, 200mM) zum Schutz vor Oxidation dem Reaktionsansatz zugefügt.

Je nach Stärke der RNA-Banden in der vorherigen Gelelektrophorese wurden 2-8 µl RNA-Lösung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit DEPC-behandeltem H₂O auf 8 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben zur Zerstörung der Sekundärstrukturen der RNA 10 min bei 68 °C im Temperaturprozessor denaturiert und danach sofort im Eisbad abgeschreckt. Dann wurden zu jeder RNA-Lösung je 5 µl „First Strand cDNA Synthesis Kit“, 1 µl Hexamer (N)₆-Primer und 1 µl DTT-Lösung gegeben und das Gemisch initial für 1 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Reverse Transkription über 60 min bei 37 °C im Temperaturprozessor. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Enzym mittels eines fünfminütigen Denaturierungsschrittes inaktiviert, um bei der folgenden PCR nicht mit der Amplifikation zu interferieren. Nach der PCR wurden zur Kontrolle die „RT-PCR-Produkte“ in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

3.4 Restriktionsenzymatische Spaltung

3.4.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme werden auch als Restriktionsendonukleasen bezeichnet und sind Bestandteil des prokaryoten Organismus, wo sie eingedrungene Fremd-DNA spalten. Die bakterieneigene DNA ist durch Methylierung der Erkennungssequenzen vor der restriktionsenzymatischen Spaltung geschützt. Für die Entdeckung dieser wichtigen biochemische Funktion der Restriktionsenzyme erhielten Werner Arber, Hamilton Smith und Daniel Nathans 1978 den Nobelpreis. Die heutzutage zahlreichen bekannten Restriktionsenzyme werden mittels Abkürzungen benannt, die auf ihren Ursprungsorganismus hinweisen, z.B. steht *ScrF I* für *Streptococcus cremoris* F. Die Restriktionsenzyme besitzen die Eigenschaft, DNA-Doppelstränge sequenzspezifisch an zumeist palindromen Erkennungssequenzen zu spalten. Ein Palindrom ist ein DNA-Abschnitt, in dem Strang und Gegenstrang in 5'→3' Richtung gelesen die gleiche Sequenz haben. Die Basen der palindromen Sequenz sind daher punktsymmetrisch zur Schnittstelle angeordnet. Restriktionsenzyme spalten die Phosphodiesterbindung an der Schnittstelle in der Regel innerhalb der Palindromsequenz.

3.4.2 Das Verfahren

Die restriktionsenzymatische Spaltung findet in der Molekularbiologie vielfältige Anwendung. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten Restriktionsenzyme zum Nachweis von Polymorphismen und Mutationen in definierten Genabschnitten eingesetzt werden, wenn durch den Polymorphismus bzw. die Mutation eine neue Spaltstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym entstanden oder weggefallen war (siehe Tabelle 16). Nach vorangegangener Amplifizierung mittels PCR wurde der Ansatz (siehe Tabelle 15) mit dem passenden Enzym bei einer für das Enzym spezifischen Temperatur über Nacht inkubiert (siehe Tabelle 17). Das PCR-Produkt wurde während dieser Zeit je nach Anzahl n der Schnittstellen in $n+1$ Fragmente zerlegt. Die analytische Trennung der Fragmente erfolgte am nächsten Tag in einem Agarosegel oder einem NuSieve-Agarosegel (siehe Tabelle 17).

Volumen	Reagenz
6 µl	PCR-Produkt
7,5 µl	HPLC-H ₂ O
1,5 µl	10 x Puffer (je nach Enzym, siehe Tabelle 17)
evtl. 0,15 µl	100 x BSA (je nach Enzym, siehe Tabelle 17)
1-2 U	Enzym (entsprechend der Enzymaktivität)

Tabelle 15: 15 µl Ansatz für eine restriktionsenzymatische Spaltung

Gen	Exon	Mutation/Polymorphismus	Enzym	Schnittstelle
RAD51	1(5'UTR)	135G>C	<i>ScrF</i> I	(5'-CCNGG-3')
XRCC2	2	R188H	<i>Hph</i> I	(5'-GGTGA(N) ₈ -3')
XRCC3	7	T241M	<i>Nla</i> III	(5'-CATG-3')
XRCC4	4	I134T	<i>Pst</i> I	(5'-CTGCAG-3')
XRCC4	8	IVS7-1G>A	<i>Tsp509</i> I	(5'-AATT-3')
XRCC4	8	921T>G	<i>Taq^a</i> I	(5'-TCGA-3')

Tabelle 16: Mit Restriktionsenzymen getestete Mutationen/Polymorphismen

Enzym	Units	Puffer	BSA	Inkubation	Testgel
<i>ScrF</i> I	1 U	NEB 4	nein	37 °C/ü.N.	NuSieve-Agarose
<i>Hph</i> I	1 U	NEB 4	nein	37 °C/ü.N.	NuSieve-Agarose
<i>Nla</i> III	1 U	NEB 4	ja	37 °C/ü.N.	NuSieve-Agarose
<i>Pst</i> I	1 U	NEB 3	nein	37 °C/ü.N.	3 % Agarose
<i>Tsp509</i> I	2 U	NEB 1	nein	65 °C/ü.N.	2,5 % Agarose
<i>Taq^a</i> I	1 U	NEB <i>Taq^a</i> I	ja	65 °C/ü.N.	3 % Agarose

Tabelle 17: Angewandte Reaktionsbedingungen

Im Folgenden werden die Ansätze der verwendeten Reaktionspuffer zur restriktionsenzymatischen Spaltung in Form von Tabellen aufgelistet.

10 mM	Bis Tris Propane-HCl
10 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT
pH 7,0 bei 25 °C	

Tabelle 18: NEBuffer 1

100 mM	NaCl
50 mM	Tris-HCl
10 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT
pH 7,9 bei 25 °C	

Tabelle 19: NEBuffer 3

50 mM	Kaliumacetat
20 mM	Tris-Acetate
10 mM	Magnesiumacetat
1 mM	DTT
pH 7,9 bei 25 °C	

Tabelle 20: NEBuffer 4

100 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl
10 mM	MgCl ₂
pH 8,4 bei 25 °C	

Tabelle 21: NEBuffer Taq α I

3.5 Trennung von Nukleinsäurefragmenten mittels Gelelektrophorese

3.5.1 Das Verfahren

Elektrophorese bezeichnet die Wanderung elektrisch geladener Teilchen durch einen als Trägermaterial dienenden Stoff in einem elektrischen Feld. Bei der Gelelektrophorese dient eine polymerisierte Gelmatrix aus beispielsweise Agarose oder Polyacrylamid als Trägermaterial, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle verhält sich proportional zur elektrischen Feldstärke und der Ionenladung sowie umgekehrt proportional zum Reibungskoeffizienten. Dieser setzt sich aus dem Teilchenradius und der Viskosität des Trägermaterials zusammen. Das Gel bildet eine Art Molekularsieb, dessen Porengröße durch unterschiedliche Polymerkonzentrationen variabel ist. Agarosegele eignen sich gut zur Trennung von DNA und RNA. Polyacrylamidgele eignen sich je nach Konzentration zur Trennung von klein- oder großmolekularen Proteinen. Zur Auswertung der Agarosegelelektrophorese kann beispielsweise die Interkalation des fluoreszierenden polycyclischen Farbstoffs Ethidiumbromid (EtBr) genutzt werden. Die Banden werden hierbei durch Anregung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese können die Proteine mit einer Silberfärbung oder immunologisch mittels Western Blot detektiert werden.

3.5.2 Agarosegelelektrophorese

Diese Methode wurde zur Trennung von DNA- und RNA-Molekülen angewandt, um beispielsweise den Erfolg einer PCR, einer restriktionsenzymatischen Spaltung oder einer RT-PCR zu überprüfen. Agarose, die Gelmatrix, setzt sich alternierend aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose-Bausteinen zusammen. Durch die Polymerisation der Agarose entsteht eine Art Maschenwerk mit Gelporen, welches die DNA- bzw. RNA-Moleküle je nach Größe unterschiedlich schnell durchwandern. Lineare doppelsträngige DNA-Moleküle bewegen sich umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe durch die Agarose-Matrix (Knippers, 1990). Je nach prozentualem Agaroseanteil sind unterschiedliche Trennbereiche angegeben (siehe Tabelle 22).

Konzentration (%)	Trennbereich für lineare DNA (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-4
2,0	0,1-3

Tabelle 22: Agarosegel-Konzentration und angegebener Trennbereich bei Gelelektrophorese in 1x TBE

3.5.2.1 Durchführung der Methode

Entsprechend der erwarteten Fragmentgröße der DNA bzw. RNA wurde die Menge an Agarosepulver auf einer Waage abgemessen und in 1 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) unter vorsichtigem Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde je nach Größe der Gelkammer die Menge der benötigten Gellösung in ein Becherglas gegossen, mit x µl Ethidiumbromidlösung $\approx 0,1 \mu\text{g/ml}$ gemischt und in die entsprechende Gelkammer gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, konnten die Kämme entfernt und das Gel mit 1 x TBE als Laufpuffer überschichtet werden. Zum Auftragen der Proben wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt mit 2,5 µl Auftragpuffer gemischt und danach möglichst ohne Luftblasen in die Geltaschen pipettiert. Zur späteren Bestimmung der Bandengröße wurde eine Geltasche mit 3 µl eines mit Auftragpuffer versetzten Längenstandards (300 ng kb-Leiter) gefüllt. Anschließend wurden die Kathode und die Anode der Gelkammer an ein Netzgerät angeschlossen und die entsprechende Voltzahl, meist 100 V, eingestellt. Die Elektrophoresedauer lag zwischen ca. 30-60 min. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Gelkammer genommen, auf einen UV-Transilluminator gelegt und zur Dokumentation photographiert.

3.5.2.2 Gellösungen, Puffer und Marker

Im Folgenden werden die zur Agarosegelelektrophorese verwendeten Gellösungen, Marker und Puffer in Tabellenform aufgeführt.

2 % Gellösung	0,6 g Agarose, ad 30 ml 1 x TBE-Puffer
2,5 % Gellösung	0,75 g Agarose, ad 30 ml 1 x TBE-Puffer
3 % Gellösung	0,9 g Agarose, ad 30 ml 1x TBE-Puffer
3 % NuSieve-Gellösung	0,9 g NuSieve-Agarose, 0,3 g Seakem-Agarose, ad 30 ml 1 x TBE-Puffer

Tabelle 23: Gellösungen

95 %	Formamid
20 mM	EDTA
0,1 %	Bromphenolblau
0,1 %	Xylencyanol

Tabelle 24: Auftragpuffer

50 µl	1 x kb-Leiter (1 µg/µl, Verdau von ΦX174-DNA)
750 µl	Aqua bidest.
200 µl	Auftragpuffer

Tabelle 25: 300 ng kb-Leiter

3.5.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.5.3.1 Das Verfahren

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde in dieser Arbeit zur Trennung von Proteinen eingesetzt. Die Gele sind chemisch inert und entstehen durch Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Polymerisationsreaktion wird durch freie Radikale ausgelöst, die durch den Zerfall von Ammoniumperoxodisulfat (APS) ($S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^-$) erzeugt und durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) stabilisiert werden.

Die denaturierende SDS-PAGE-Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung von Proteinen anhand ihrer Molekülgröße (Laemmli, 1970). Durch Micellenbildung mit dem anionischen

Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) werden die effektiven Eigenladungen der Proteine überdeckt und die Trennung erfolgt hauptsächlich anhand des Teilchenradius. Darüber hinaus zerstört SDS die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch Spaltung von Wasserstoffbrückenbindungen (Denaturierung). Dies führt zur Entfaltung der Polypeptidkette und ermöglicht so ein besseres Laufverhalten. Disulfidbindungen innerhalb der Proteinstrukturen können nicht von SDS gespalten werden, so dass zusätzlich β -Mercaptoethanol zum Ladepuffer zugegeben werden muss. Die beschriebenen Denaturierungsvorgänge werden durch Erhitzen auf 96 °C für einige Minuten im Heizblock noch verstärkt.

3.5.3.2 Durchführung der Methode

In dieser Arbeit wurde die Mini-Protean-Cell II[®] Kammer von Biorad verwendet. Vor dem Zusammensetzen der Apparatur wurden die Glasplatten mit Ethanol gereinigt. Das Trenngel wurde bis 2,5 cm unter die Oberkante der kleinen Glasplatte gegossen und sofort danach mit Aqua bidest. überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Aqua bidest. wieder aus der Apparatur gegossen. Letzte Flüssigkeitsreste wurden mit einem Löschpapier vorsichtig entfernt. Im Anschluss wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und die Kämme eingefügt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurden die Kämme vorsichtig herausgezogen und die Geltaschen gründlich mit Aqua bidest. gespült.

Während der Polymerisationszeit der Gele konnten die Proben vorbereitet werden. Die Proteinkonzentration wurde vorab photometrisch bestimmt. Um für alle Proben die gleiche Menge an Protein auf das Gel auftragen zu können, musste in einem zweiten Schritt eine Verdünnung mit Aqua bidest. errechnet werden. Dabei betrug das Endvolumen jeder aufgetragenen Probe 25 μ l inklusive 5 μ l des Ladepuffers.

In ein 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde zunächst die entsprechende Menge an Aqua bidest. pipettiert, danach der Ladepuffer und zuletzt das Protein zugegeben. Die Proben wurden 3 min bei 96 °C im Heizblock denaturiert und abschließend kurz zentrifugiert. Nachdem die Gelkammern in die Elektrophorese-Einheit eingesetzt worden waren und die Apparatur mit 1 x GTS-Puffer gefüllt worden war, konnten die Proben mit speziellen Kapillarspitzen (Biozym) aufgetragen werden. In eine Tasche des Gels wurde ein Protein-Längenstandard (New England Biolabs oder Invitrogen) zur späteren Bestimmung der Molekülmassen der Proteine aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 80 V gestartet. Die Proben durchliefen zunächst das großporige 3 % Sammelgel zur Konzentrierung der Polypeptide. Nachdem die Proben das Sammelgel komplett durchlaufen hatten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Im Trenngel wurden die Proteine dann entsprechend ihres

Molekulargewichts getrennt. Der Lauf konnte nach ca. 2-3 h beendet werden. Die Gelplatten wurden nun aus der Apparatur herausgenommen und die Glasplatten auseinandergehelt. Das Sammelgel wurde vorsichtig abgetrennt und verworfen. Mit dem Trenngel wurde anschließend ein Western Blot durchgeführt.

3.5.3.3 Gellösungen und Puffer

Die Tabelle 26 zeigt eine Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele der SDS-PAGE. Tabelle 27 beschreibt die Zusammensetzung des verwendeten Lade- und Elektrodenpuffers.

Reagenzien	12,5 % Trenngel	15 % Trenngel	Sammelgel
40 % Acrylamid	1,6 ml	1,9 ml	0,32 ml
2 % Bis-Acrylamid	0,25 ml	0,22 ml	0,175 ml
1 M Tris-HCl pH 8,7	1,88 ml	1,88 ml	
1 M Tris-HCl pH 6,9			0,313 ml
20 % SDS	25 µl	25 µl	12,5 µl
Aqua bidest.	1,28 ml	1,0 ml	1,69 ml
TEMED	5 µl	5 µl	10 µl
10 % APS	25 µl	25 µl	20 µl

Tabelle 26: Verwendete Gellösungen

Puffer	Volumen	Reagenz
Ladepuffer (5x)	4 µl	Bromphenolblau (1mg/ml H ₂ O)
	40 µl	SDS (10 %)
	25 µl	0,5 M Tris, pH 6,8
	3 µl	Glycerin
	10 µl	2-β-Mercaptoethanol
Elektrodenpuffer (1 x GTS-Puffer)	100 ml	10 x GTS
	900 ml	Aqua bidest.

Tabelle 27: Verwendete Ladungs- und Elektrodenpuffer

3.6 Sequenzierung mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyser

3.6.1 Das Verfahren

Die Sequenzierung erfolgte in dieser Arbeit nach der von Sanger 1977 entwickelten Didesoxymethode in einem automatisierten Verfahren mit dem Kapillarsequenzierer ABI PRISM 310 Genetic Analyser. Die zu sequenzierende DNA wurde zunächst mittels PCR amplifiziert und im Anschluss mit einer PEG-Präzipitation aufgereinigt (siehe 3.1.3). Der Sequenzieransatz enthält bei der Didesoxymethode nach Sanger neben Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) in kleiner Menge auch Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs), welche basenspezifisch mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Sequenzierreaktion ähnelt einer PCR, allerdings erfolgt eine lineare Vervielfältigung nur eines Stranges und es fehlt der abschließende Elongationszyklus. Nach einer Vordenaturierung erfolgt die DNA-Neusynthese an der einzelsträngigen Matrizen-DNA in 5'→3' Richtung von einem ca. 20 Nukleotide langen Primer aus mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Durch den zufälligen Einbau eines basenspezifischen Didesoxyribonukleotids kommt es zum Kettenabbruch, da durch das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe am ddNTP keine Phosphordiesterbindung mit einem weiteren Nukleotidbaustein gebildet werden kann. Da die ddNTPs dem Reaktionsansatz in viel geringerer Konzentration als die dNTPs beigelegt werden, kommt es in statistischer Verteilung immer wieder an einer der vielen Positionen, an denen das Nukleotid vorkommt, zu einem Abbruch der DNA-Synthese und somit zu Fragmenten mit unterschiedlicher Länge. Der ABI PRISM 310 Genetic Analyser ermöglicht durch Kapillarelektrophorese die Trennung dieser einzelnen Fragmente, wobei die Detektion und Differenzierung über die Fluoreszenzmarkierung der ddNTPs erfolgt. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Software „Sequencing Analysis“ des Herstellers (Applied Biosystems).

3.6.2 Durchführung

Nach Reinigung des PCR-Produkts durch PEG-Präzipitation (siehe 3.1.3) wurden 5 µl der Probe auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Je nach Bandenstärke des gereinigten PCR-Produkts im Gel wurden 1-4 µl in den 10µl Ansatz zur Sequenzierreaktion (siehe Tabelle 28) eingesetzt. Die Sequenzierreaktion lief automatisch mit Hilfe eines Programms (siehe Tabelle 29) des Temperaturprozessor zur PCR ab.

Volumen	Reagenz
1 µl	Primer (5 pmol)
1,5 µl	BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq [®] DNA Polymerase (Applied Biosystems)
1-4 µl	gereinigtes PCR-Template
x µl	HPLC-H ₂ O ad 10 µl

Tabelle 28: 10 µl Ansatz zur Sequenzierreaktion

Programmablauf			Zeit	Temperatur	Zyklen
1.	Vordenaturierung		300 sec	95 °C	1
2.	Amplifizierung	Annealing	15 sec	50 °C	26
		Elongation	240 sec	60 °C	
		Denaturierung	30 sec	95 °C	

Tabelle 29: Sequenzier-Programm im Temperaturprozessor

Nach der Sequenzierreaktion wurden 1 µl 3 M Natriumacetatlösung und 30 µl 100 % Ethanol in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit 10 µl der Probenlösung vermischt. Nach 60 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur an einem abgedunkelten Ort wurden die Proben für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand abgenommen und das Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen werden. Der Ansatz wurde erneut für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Im Anschluss wurde das Pellet für ca. 5 min bei 50 °C im Heizblock getrocknet und danach in 25 µl 95 % Formamid während 1 h Inkubationszeit lichtgeschützt an einem abgedunkelten Ort bei Raumtemperatur gelöst. Vor der kapillarelektrophoretischen Trennung wurden die Proben für 3 min bei 93 °C denaturiert, sofort danach auf Eis abgekühlt und anschließend in spezielle Sequenziergefäße mit Gummisepta überführt. Die Elektrophorese erfolgte nach den Angaben des Herstellers bei 50 °C und 7,5 kV im POP 6-Polymer.

3.7 Fragmentlängenanalyse mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyser

3.7.1 Methode

In dieser Arbeit wurde eine Fragmentlängenanalyse von RT-PCR-Produkten durchgeführt. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Primern. Während der Kapillarelektrophorese durch den ABI PRISM 310 Genetic Analyser werden die RT-PCR-Produkte einzeln der Größe nach getrennt und passieren nacheinander einen Laserstrahl, welcher sie aufgrund ihrer Fluoreszenzemission erkennt. Die Fluoreszenzintensität wird gemessen und die elektrophoretische Mobilität wird mit Hilfe der GeneScan Analysis-Software mit einem parallel gemessenen Längenstandard bestehend aus DNA-Fragmenten bekannter Fragmentlänge verglichen und so in Basenpaaren übersetzt. Als Matrix dient hierbei ein Spektrum aus verschiedenen Wellenlängen ROX (615 nm), NED (580 nm), JOE (559 nm), 6-FAM (535 nm). Zur Auswertung wurde den Fluoreszenzmarkierungen mit Hilfe des Computerprogramms unterschiedliche Falschfarben zugeordnet ROX (rot), NED (gelb), JOE (grün), 6-FAM (blau).

3.7.2 Durchführung

Zunächst wurde die cDNA-Amplifikation mit einem fluoreszenzmarkierten Primer (6-FAM) unter herkömmlichen PCR-Bedingungen durchgeführt (40 µl Ansatz, siehe 3.2.2). Zur Fragmentlängenanalyse wurden 0,5 µl *Genescan*TM-500ROX-Längenstandard und 20 µl 95 % Formamid in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt. Anschließend wurden 1 µl des PCR-Produkts dazugegeben, der Ansatz bei 93 °C für 2 min im Heizblock denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Schließlich wurden die Proben in die Sequenzierhütchen überführt, mit Gummisepta verschlossen und in den Träger des ABI PRISM-Gerätes eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers analog zur Sequenzierung bei 60 °C im POP-6-Polymer.

3.8 Zellkultur aus Lymphozyten

3.8.1 Methode

Das Epstein Barr Virus infiziert neben naso- und oropharyngealen Epithelzellen auch B-Lymphozyten. *In vivo* werden infizierte B-Lymphozyten zu einem großen Teil durch das Immunsystem eliminiert. Bei immundefizienten Patienten sowie *in vitro* kommt es jedoch zur unkontrollierten Proliferation EBV-infizierter, immortalisierter B-Lymphozyten. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von „Transformation“. *In vitro* wird die „Transformation“ der B-Lymphozyten zum Anlegen einer Zellkultur genutzt. Um die aus dem Vollblut gewonnenen Lymphozyten erfolgreich mit dem Virus zu infizieren, muss das Virus „ausgehungert“ sein; d.h. die EBV-Linie, welche einmal pro Woche mit RPMI 1640 Medium inkl. 10-15 % foetalem Kälberserum (FKS) gefüttert wird, muss sich im Hungerzustand befinden. Technisch ist dies möglich, wenn parallel zwei EBV-Linien geführt werden und diese immer zeitversetzt gefüttert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die EBV-Linie B95-8 zur „Transformation“ verwendet.

3.8.2 Anlegen einer lymphoblastoiden Zelllinie aus heparinisierem Vollblut

Die Aufarbeitung wurde in Anlehnung an die von H. Neitzel (1986) veröffentlichte Methode durchgeführt.

Die benötigten Medien wurden vor Beginn im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an der Werkbank durchgeführt. Aus einer Blutprobe wurden in der Regel zwei Zelllinien angelegt.

10 ml heparinisieretes Vollblut wurden in ein 50 ml Falcongefäß überführt und im Verhältnis 1:1 mit RPMI-Medium vermischt. In zwei weitere 50 ml Falcongefäße wurden anschließend 30 ml Ficoll-Medium vorgelegt und danach mit je 10 ml des Blut/RPMI-Gemisches überschichtet. Im Anschluss wurde für 30 min ohne Bremse und bei Raumtemperatur bei 1250 rpm zentrifugiert. Der Leukozytenring in der Interphase wurde daraufhin vorsichtig mit einer Pasteurpipette in kreisförmigen Bewegungen abgenommen und in ein 15 ml Falcongefäß mit 8-10 ml frischem RPMI-Medium überführt. Danach wurde erneut für 10 min mit Bremse bei 1250 rpm zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand verworfen, das Zellpellet mit dem verbliebenen Rest an RPMI-Medium resuspendiert und in eine 50 ml Zellkulturflasche, in welche vorher 2 ml RPMI-Medium und 1 ml FKS vorgelegt wurden, überführt werden. Am Ende wurden 2 ml der EBV-Zelllinie dazugegeben, welche zuvor zweimal mit einem Sterilfilter (0,45 µm) filtriert worden waren, um Kontaminationen durch

andere Mikroorganismen wie Bakterien zu vermeiden. Zu diesem Zweck enthielt das RPMI-Medium auch einen Zusatz an Streptomycin und Penicillin (siehe 2.5). Die Zelllinien und die EBV-Linie wurden im Anschluss bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.8.3 Bestrahlung der Zelllinien

Zur funktionellen Western Blot Analyse wurden einige Zelllinien mit 40 Gy durch den Linearbeschleuniger MX-2 (Siemens, 6 MV Photonen) bestrahlt. Einen Tag vor der Bestrahlung wurden die Zelllinien mit RPMI-Medium gefüttert und je 10 ml in 25 ml Zellkulturflaschen überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank für 60 min inkubiert.

3.9 Lambda-Protein-Phosphatase-Behandlung

3.9.1 Methode

In funktionellen Analysen des XRCC4-Proteins wurde die Lambda-Protein-Phosphatase eingesetzt. Protein-Kinasen können Proteine phosphorylieren, Phosphatasen sind im Stande sie wieder zu dephosphorylieren. Durch die Phosphorylierung wird die biologische Aktivität der Proteine verändert. Für die große Gruppe der Proteinkinasen kann eine Einteilung nach dem Aminosäurerest, welchen sie phosphorylieren, getroffen werden. Es gibt Tyrosin-spezifische, Serin- und Threonin-spezifische Kinasen. Die Lambda-Protein-Phosphatase dephosphoryliert sowohl Tyrosin- als auch Serin- und Threonin-Reste.

In dieser Arbeit wurde eine Lambda-Protein-Phosphatase-Behandlung zur Analyse der strahleninduzierten Phosphorylierung des XRCC4-Proteins eingesetzt. Nach der Bestrahlung (siehe 3.8.3) wurden 10 ml Zellsuspension in einem 15 ml Falcongefäß für 5 min bei 1300 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde vorsichtig resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Der 10 µl Reaktions-Ansatz (siehe Tabelle 30) wurde anschließend auf das Zellpellet gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 30 °C. Danach wurde mit den Proben ein Western Blot durchgeführt.

Volumen	Reagenz
1 µl	10 x Lambda-Protein-Phosphatase-Puffer (siehe 2.5)
1 µl	10 x MnCl ₂
5,5 µl	HPLC-H ₂ O
2,5 µl	Lambda-Protein-Phosphatase (400 U/µl)

Tabelle 30: 10 µl Reaktionsansatz zur Lambda-Protein-Phosphatase-Behandlung

3.10 Proteinextraktion und –konzentrationsbestimmung

3.10.1 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion aus einer lymphoblastoiden Zelllinie wurden ca. 10 ml Zellsuspension in 15 ml Falcongefäße überführt und bei Raumtemperatur und 1300 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet mit 5 ml auf Eis gekühltem 1 x PBS gewaschen. Danach wurde nochmals unter gleichen Bedingungen für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vollständig abgenommen, und je nach Pelletgröße wurden das zwei- bis dreifache an frisch angesetzttem Lysispuffer (siehe Tabelle 31) dazugegeben und resuspendiert, bei z.B. ca. 50 µl Pellet waren dies 120 µl Lysispuffer. Die Lyse der Zellen erfolgte während einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis. Danach wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Die Proteinlösung befand sich anschließend im Überstand und wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Der am Boden befindliche Zellschutt konnte verworfen werden. Die Proteinextrakte wurden bei -70 °C aufbewahrt und konnten für mehrere Versuche verwendet werden. Als Waschlösung wurde 1x PBS (siehe 2.5) verwendet.

Lysispuffer (10 ml)		
50 mM	Tris-Cl (pH 7,4)	0,5 ml
150 mM	NaCl	1,5 ml
2 mM	EGTA	1 ml
2 mM	EDTA	40 µl
25 mM	NaF	0,01 mg in 500 µl Aqua bidest.
25 mM	β-Glycerophosphat	0,25 ml
0,1 mM	NaVanadat	Spur in 500 µl Aqua bidest.
0,1 mM	PMSF	5 µl
50 µg	Leupeptin	5 µl
100 µg	Aprotinin	1 µl
0,2 %	Triton	20 µl
0,3 %	NP-40	30 µl
	Aqua bidest.	ad 10 ml

Tabelle 31: Lysispuffer

3.10.2 Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der farbstoffbindenden Methode, welche von M. Bradford (1976) erstmals veröffentlicht wurde. In meiner Arbeit wurde der Protein Assay der Firma Biorad verwendet. Die Messungen wurden bei 595 nm am Eppendorf-(Bio)Photometer durchgeführt. Vor Beginn der Messungen wurde gemäß Tabelle 32 eine Standardreihe zur Kalibrierung des Gerätes angefertigt. Zu jeder Verdünnung der Standardreihe wurden 200 µl „Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ (Biorad) dazugegeben. Die Kalibrierung erfolgte automatisch durch das Eppendorf-(Bio)Photometer.

Die Proteinlösungen wurden vor der Messung 1:500 verdünnt. Dafür wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß 798 µl HPLC-H₂O vorgelegt und 2 µl Proteinextrakt darin gelöst. Anschließend wurden 200 µl „Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ (Biorad) hinzugefügt und die Messungen durchgeführt.

Standard	1	2	3	4	5	6
HPLC-H ₂ O [µl]	800	780	760	740	720	700
BSA (1mg/10ml) [µl]	0	20	40	60	80	100
BSA Konzentration [µg/µl]	0	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01

Tabelle 32: Standardmessreihe

3.11 Western Blot

3.11.1 Methode

Beim Western Blot werden in einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Towbin et al., 1979). Der Elektronentransfer findet zwischen zwei Plattenelektroden, einer mit Platin überzogenen Titanelektrode (Anode) und einer Edelstahlelektrode (Kathode), statt. Die Membran wird vor der Anode platziert, so dass die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel von der Kathodenseite auf die Membran wandern. Die Proteine adsorbieren mittels Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen an die Membran und werden somit immobilisiert, d.h. ihre Diffusion wird verhindert. Da die Proteine ihre Immunreaktivität noch besitzen, können sie anschließend mit Hilfe von Antikörpern quantitativ und qualitativ nachgewiesen werden. Dafür werden die Membranen nacheinander mit zwei Antikörpern inkubiert. Der erste Antikörper ist spezifisch für das gesuchte Protein und bildet mit diesem einen Antigen-Antikörper-Komplex. Durch Zugabe eines zweiten enzymgekoppelten Antikörper, welcher am primären Antikörper bindet, kann das Antigen indirekt detektiert werden. Als antikörpergekoppeltes Enzym wurde in dieser Arbeit Meerrettich-Peroxidase (HRP) eingesetzt, welches die Oxidation von Luminol durch oxidierende Substanzen katalysiert. Luminol sowie die oxidierenden Substanzen waren im „Chemiluminescence Reagent Plus Kit“ (NEN life Science Products) enthalten. Das oxidierte Luminol entsendet Photonen mit einer Wellenlänge von 428 nm. Die Lichtemission und somit die Detektion des Proteins wird im Anschluss auf einem Röntgenfilm dokumentiert. Soweit sich nach der Exposition der Antikörper auch wieder auswaschen lässt, besteht die Möglichkeit, mehrere Assays mit derselben Membran hintereinander durchzuführen.

3.11.2 Durchführung

In dieser Arbeit wurden die Western Blots mit der Mini Blot Transfer Cell der Firma Biorad durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden eine Nitrocellulosemembran und fünf Whatman Filterpapiere auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und zusammen mit zwei Schwämmen des Blottingsystems für einige Minuten in kaltem Transferpuffer (siehe Tabelle 33) eingeweicht. Ein weiteres zugeschnittenes Whatman Papier wurde anschließend so auf das Trenngel aufgelegt, dass es sich von der darunter befindlichen Glasplatte ablöste. Anschließend wurde die Kassette der Blot-Apparatur in folgender Reihenfolge möglichst luftblasenfrei von der Kathoden- zur Anodenseite beschickt: Schwamm, zwei Filterpapiere,

Gel, Membran, Filterpapier, Schwamm. Die Kassetten wurden verschlossen und mit der Membran zur Anodenseite gerichtet in die Blot-Apparatur eingesetzt. Im Anschluss wurde die Blot-Apparatur mit kaltem Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte für ca. 3-4 h bei 35-40 V und 4 °C im Kühlraum. Nach Beendigung des Western Blots wurde die Membran für 1 h in Blocking Lösung (siehe Tabelle 34) auf einem Kipptisch mit Wippbewegungen bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen mit dem ersten Antikörper (siehe Tabelle 36) in Plastikfolie eingeschweißt auf dem Kipptisch platziert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Waschlösung angefertigt (siehe Tabelle 35), mit welcher der erste Antikörper in drei Waschschritten (für je 10 min) von den Membranen entfernt wurde. Danach wurde mit dem zweiten Antikörper (siehe Tabelle 36) für mindestens 2-3 h oder über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen erneut dreimal mit Waschlösung gewaschen. Zur Detektion mit den „Chemiluminescence Reagent Plus Kits“ wurden die Lösungen I und II in gleichen Mengen gemischt und luftblasenfrei auf die, mit der Proteinseite nach oben liegende, Membran pipettiert. Zur einminütigen Inkubation wurde der Raum abgedunkelt. Anschließend wurde die Membran zügig von der überschüssigen Reaktionsflüssigkeit befreit, mit einer Folie abgedeckt, in die Filmkassette eingelegt und luftblasenfrei glattgestrichen. Die Expositionszeit mit dem Röntgenfilm lag je nach Intensität der Reaktion zwischen einigen Sekunden bis fünf Minuten.

Volumen	Reagenz
100 ml	10 x Carbonat-Puffer (siehe 2.5)
700 ml	Aqua bidest.
200 ml	MeOH
1,8 ml	20 % SDS

Tabelle 33: Transferpuffer (1 x Carbonat-Puffer)

Volumen	Reagenz
0,5 %	Magermilch
0,05 %	Tween 20
ad 1 Liter	1 x PBS (siehe 2.5)

Tabelle 34: Blocking-Lösung

Volumen	Reagenz
0,05 %	Tween 20
ad 1 Liter	1 x PBS

Tabelle 35: Wasch-Lösung

Antikörper	Volumen	Verdünnung in 25 ml Blocking-Lösung
1. Antikörper		
mAK Maus-anti-human RAD51 (α -1G8)	25,0 μ l	1:1000
pAK Kaninchen-anti-human XRCC4 (AHP387)	10,0 μ l	1:2500
2. Antikörper		
pAK Schaf-anti-Maus IgG-HRP konjugiert	5,0 μ l	1:5000
pAK Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP konjugiert	5,0 μ l	1:5000
mAK Maus-anti-human β -Actin	12,5 μ l	1:2000

Tabelle 36: Verwendete Antikörper-Lösungen

4 Ergebnisse

4.1 Direkte Mutationsanalyse

4.1.1 *RAD51**135G>C-Screening

Die *RAD51*-Promotorvariante 135G>C, welche zwei Berichten zufolge mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko für *BRC A2*-Mutationsträgerinnen assoziiert ist (Levy-Lahad et al., 2001; Wang et al., 2001), wurde im Kollektiv der Patientinnen mit bilateralem Mammakarzinom durch restriktionsenzymatische Spaltung direkt getestet. Ihre Häufigkeit wurde anschließend mit der in einem Kollektiv unilateraler Brustkrebspatientinnen und mit der in einer Stichprobe aus der Durchschnittsbevölkerung verglichen.

Zur Analyse der *RAD51*-Variante 135G>C wurde mit den Primern *RAD51*-AF und *RAD51*-RR eine 157 bp große Region amplifiziert, welche das Nukleotid 135 umfasste. Hierfür wurden zunächst Optimierungen der PCR bei Annealingtemperaturen von 54-66 °C durchgeführt. Bei 63 °C lief die Reaktion optimal ab, d.h. es fanden sich keine Nebenprodukte und die Bande des PCR-Produkts war am stärksten sichtbar. Zur weiteren Optimierung wurde die Zahl der Amplifizierungszyklen auf 31 reduziert. Ferner wurden die unter 3.2.2 aufgeführten Standardbedingungen gewählt. Danach wurde eine restriktionsenzymatische Spaltung mit dem Restriktionsenzym *ScrF* I (5'...CC[↓]NGG...3') durchgeführt (siehe 3.4.2). Die DNA-Fragmente wurden nach der Inkubationszeit in einem NuSieve-Agarosegel mit Ethidiumbromid in 1 x TBE-Puffer elektrophoretisch getrennt (siehe Abbildung 7a).

Bei homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels *RAD51**135G existiert in der amplifizierten Region von 157 Basenpaaren eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *ScrF* I. Im Restriktionsverdau mit *ScrF* I wird das PCR-Produkt in zwei Fragmente gespalten, welche 85 bp und 72 bp groß sind. Durch den Basenaustausch 135G>C wird die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *ScrF* I zerstört. Bei Heterozygotie für die Variante *RAD51**135C erfolgte die Spaltung entsprechend nur unvollständig, bei Homozygotie gar nicht.

Von 120 bilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen wiesen 16 Patientinnen die *RAD51*-Promotorvariante 135G>C in heterozygoter Ausprägung auf. Eine homozygote Trägerin konnte nicht nachgewiesen werden. In dem Vergleichskollektiv waren unter 120 unilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen zwölf heterozygote und vier homozygote Trägerinnen. In der Stichprobe aus der Durchschnittsbevölkerung konnten unter 120 Individuen 13 heterozygote Träger der *RAD51**135G>C-Promotorvariante detektiert werden. Ein homozygoter Allelträger war nicht nachweisbar.

4.1.2 *RAD51135G>C bei männlichen Brustkrebspatienten**

Der im Vergleich zur Frau ca. 100-fach seltener auftretende Brustkrebs bei Männern ist häufig mit *BRCA2*-Mutationen assoziiert (Haraldsson et al., 1998). Da *RAD51* direkt mit *BRCA2* interagiert, wurden vier männliche Brustkrebspatienten (Proben A282, A300, A941 und A988), welche ebenfalls in der Abteilung für Strahlentherapie und Spezielle Onkologie der Medizinischen Hochschule behandelt worden waren, in die Analyse der Variante *RAD51**135G>C miteinbezogen. Zwei Patienten wurden mittels restriktionsenzymatischer Spaltung als homozygote *RAD51**135C-Allelträger detektiert (A941, A988). Dies Ergebnis wurde mit einer Sequenzierreaktion gemäß 4.1.5 bestätigt. Die Vermutung, die Variante *RAD51**135G>C könne bei männlichen Brustkrebspatienten überproportional häufig auftreten, war für mich Anlass, ein zusätzliches Patientenkollektiv von 20 männlichen Mammakarzinompatienten der Universität Würzburg (Proben W1-W20, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bernhard Weber) mittels Restriktionsspaltung durch *ScrF* I auf den Polymorphismus hin zu überprüfen. Unter diesen 20 Patienten wurden jedoch lediglich zwei heterozygote Allelträger der *RAD51*-Variante 135G>C (W15, W19) identifiziert; ein weiterer homozygoter Allelträger konnte nicht nachgewiesen werden.

4.1.3 *XRCC2*-Mutation R188H (c.563G>A)

Ein erhöhtes Brustkrebsrisiko wurde auch bei den seltenen homozygoten Trägerinnen der Variante R188H des *XRCC2*-Gens vermutet (Kuschel et al., 2002). Hier liegt im Exon 2 des *XRCC2*-Gens ein Basenaustausch vor. Am Nukleotid c.563 wird ein Guanin durch ein Adenin ersetzt. Dadurch kommt es zu einer Aminosäuresubstitution an der Codonposition 188 von Arginin zu Histidin (CGC→CAC). In den von mir untersuchten Kollektiven von Brustkrebspatientinnen sollte geprüft werden, ob homozygote Trägerinnen der Variante *XRCC2**188H ein höheres Brustkrebsrisiko aufweisen als Trägerinnen beider Wildtypallele.

Nach Optimierung einer PCR bei Annealingtemperaturen von 54-66 °C erfolgte die Amplifikation einer 870 bp langen Sequenz des Exon 2 mit den Primern *XRCC2*-2F und *XRCC2*-2R bei 63 °C unter den Standardbedingungen der PCR (siehe 3.2.2). Die *XRCC2*-Variante R188H wurde von mir im bilateralen sowie unilateralen Patientenkollektiv und dem Kollektiv aus der Durchschnittsbevölkerung mittels Restriktionsspaltung durch das Enzym *Hph* I (5'...GGTGA(N)₈[↓]...3') detektiert (siehe 3.4.2). Die DNA-Fragmente wurden hierfür in einem NuSieve-Agarosegel mit Ethidiumbromid in 1 x TBE-Puffer elektrophoretisch getrennt (siehe Abbildung 7b).

Ohne den Basenaustausch liegen für *Hph* I innerhalb der amplifizierten Sequenz drei Schnittstellen vor. Das PCR-Produkt wird in drei Fragmente von 340 bp, 305 bp und 225 bp zerlegt. Durch den Polymorphismus *XRCC2**R188H entsteht eine weitere Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym, welches das 305 bp lange Fragment erneut in 161 bp und 144 bp lange Sequenzen teilt.

Im Kollektiv der 120 bilateral betroffenen Mammakarzinompatientinnen konnten 15 heterozygote Trägerinnen der *XRCC2*-Variante R188H identifiziert werden, bei einer Patientin konnte die Substitution in homozygoter Ausprägung nachgewiesen werden. Eine Familienanalyse zeigte, dass die Mutter der Patientin ebenfalls einen homozygoten und die Schwester einen heterozygoten Genotyp der *XRCC2*-Variante R188H tragen. In dieser Familie wurde ebenfalls die *BRCA1*-Mutation 5382insC nachgewiesen. Die Patientin war mit 34 Jahren am Erst- und mit 42 Jahren am Zweitumor erkrankt. Zum Zeitpunkt der durchgeführten Analyse waren Mutter und Schwester der Patientin nicht am Mammakarzinom erkrankt. In dem Vergleichskollektiv wurden von 120 unilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen 15 heterozygote Trägerinnen der *XRCC2*-Variante R188H nachgewiesen. In dem zweiten Vergleichskollektiv aus der Durchschnittsbevölkerung konnten 19 heterozygote Allelträger detektiert werden. In beiden Vergleichskollektiven wurde die Variante nicht in homozygoter Ausprägung nachgewiesen.

4.1.4 *XRCC3*-Mutation T241M (c.722C>T)

Kuschel et al. (2002) vermuteten ebenfalls eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit für Brustkrebs bei homozygoten Trägerinnen der Mutation T241M des *XRCC3*-Gens. Durch diese Variante wird Cytosin im Exon 7 am Nukleotid c.722 durch Thymin ersetzt. Der Basenaustausch führt bei der Translation des 241. Codons zum Einbau der Aminosäure Methionin anstelle von Threonin in die Polypeptidkette (ACG→AUG).

Um den von Kuschel et al. (2002) postulierten Zusammenhang zwischen der Variante T241M und einem erhöhten Brustkrebsrisiko zu prüfen, wurde ein Testverfahren etabliert. Die Polymerasekettenreaktion mit den Primern *XRCC3*-7F und *XRCC3*-7R wurde vorab bei Annealingtemperaturen von 54-66 °C optimiert. Die Reaktion wurde danach bei 63 °C unter Standardbedingungen (siehe 3.2.2) durchgeführt. Das 300 bp große PCR-Produkt wurde anschließend über Nacht mit *Nla* III (5'...CATG[↓]...3') restriktionsenzymatisch gespalten (siehe 3.4.2.). Die DNA-Fragmente wurden im Anschluss in einem NuSieve-Agarosegel mit Ethidiumbromid in 1 x TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abbildung 7c).

Bei homozygoten Allelträgern für *XRCC3**241T liegt in der amplifizierten Region nur eine Schnittstelle für das Enzym vor. In diesem Fall sind nach dem Verdau zwei Spaltprodukte

von 207bp und 93 bp Größe nachweisbar. Durch die Substitution *XRCC3**T241M wird eine zusätzliche Schnittstelle geschaffen, welche das 207 bp große Fragment in Sequenzen von 102 bp und 105 bp teilt.

Unter 120 bilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen wiesen 54 Frauen die Methioninvariante als heterozygote Trägerinnen auf. 20 Patientinnen waren homozygote Trägerinnen. Im Kontrollkollektiv konnte unter 120 unilateral betroffenen Mammakarzinompatientinnen die Substitution 60-mal in heterozygoter und 20-mal in homozygoter Ausprägung nachgewiesen werden. Im Kollektiv aus der Durchschnittsbevölkerung wurden 53 heterozygote und 17 homozygote Allelträger der Mutation T241M detektiert.

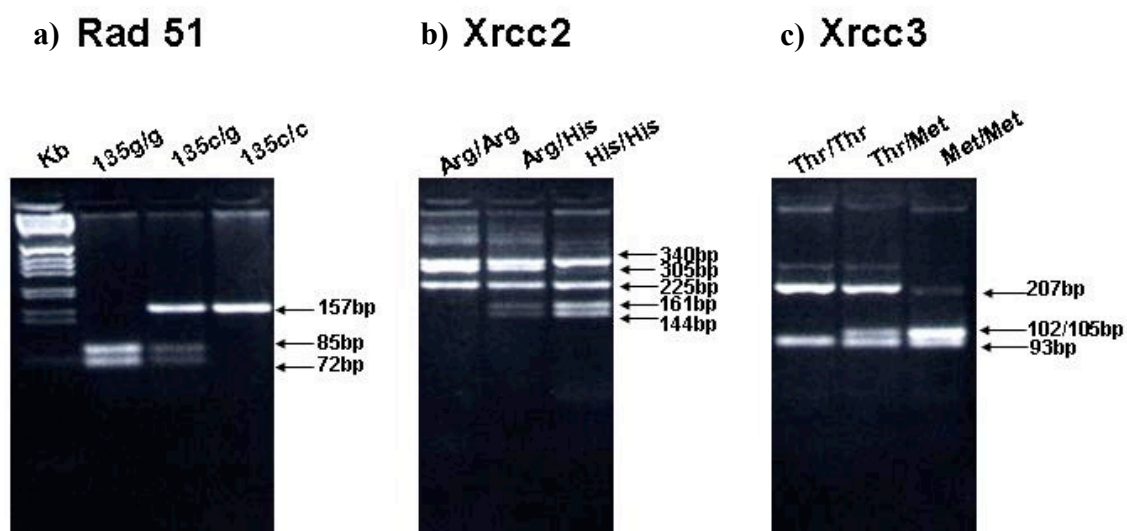


Abbildung 7: Mutationsscreening *RAD51*, *XRCC2* und *XRCC3*

- a) Polymorphismus in der Promotorregion des *RAD51*-Gens (135G>C). Restriktionsenzymatische Spaltung mit *ScrF* I.
- b) Missense Substitution (Arg/His) in Exon 2 des *XRCC2*-Gens. Restriktionsenzymatische Spaltung mit *Hph* I.
- c) Missense Substitution (Thr/Met) in Exon 7 des *XRCC3*-Gens. Restriktionsenzymatische Spaltung mit *Nla* III.

4.1.5 Sequenzierung der *RAD51*-Promotorvariante 135G>C

Um die Identifizierung der *RAD51*-Promotorvariante 135G>C mit einem direkten Testverfahren zu bestätigen, wurde eine Sequenzierreaktion etabliert. Die vorausgehende Amplifikation wurde wie bei der Mutationsanalyse mit dem Primerpaar *RAD51*-AF und *RAD51*-RR durchgeführt. Es wurden 50 µl Ansätze pro Probe zur PCR verwendet (siehe 3.2.2, Tabelle 12). Um bestmögliche Sequenzierungsergebnisse zu erhalten, wurden die PCR-Produkte mittels PEG-Präzipitation (siehe 3.1.3) gereinigt. Die Sequenzierreaktion wurde im Anschluss gemäß 3.6.2 durchgeführt.

Es wurden drei homozygote Trägerinnen der Variante *RAD51**135C (A122, A124, A311) unter den unilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen sowie zwei homozygote Träger für *RAD51**135C unter den männlichen Brustkrebspatienten (A941, A988) und ein männlicher Brustkrebspatient mit beiden Wildtypallelen (A282) für die Sequenzierung ausgewählt. Bei der Sequenzierung konnte zusätzlich der bereits von Wang et al. (2001) beschriebene *RAD51**Polymorphismus 172T>G nachgewiesen werden. Alle Allelträger *RAD51**135C/C waren ebenso homozygot *RAD51**172G/G. Die Probe A282 mit den Allelen *RAD51**135G/G war hingegen homozygot *RAD51**172T/T. Dies Ergebnis bestätigt die Vermutung von Wang et al. (2001), dass die *RAD51*-Polymorphismen 135G>C und 172T>G in der Promotorregion in einem Kopplungsungleichgewicht stehen.

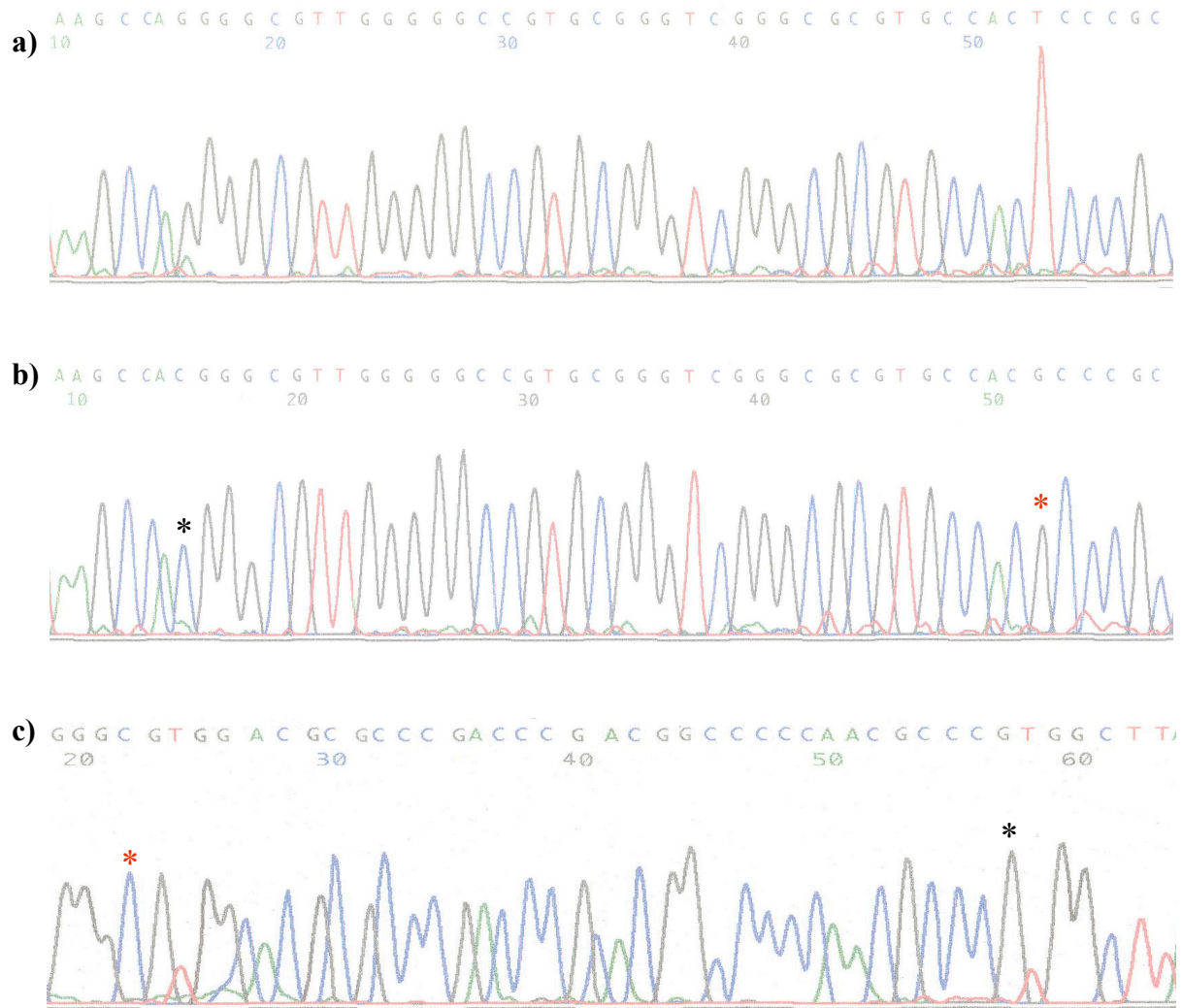


Abbildung 8: Sequenzierung der *RAD51*-Promotorregion

a) *RAD51**135G/G,172T/T. (Probe A282), Sequenzierung des Sinnstranges

b) *RAD51**135C/C,172G/G (Probe A122), Sequenzierung des Sinnstranges

c) *RAD51**135C/C,172G/G (Probe A122), Sequenzierung des komplementären Stranges

Die Markierung (*) zeigt Homozygotie für das Allel 135C, (*) zeigt Homozygotie für das Allel 172G.

4.2 Mutationssuche im *XRCC4*-Gen

4.2.1 Einleitung

Neben der direkten Mutationsanalyse in den Reparaturgenen *RAD51*, *XRCC2* und *XRCC3* war es Ziel dieser Arbeit, in dem zum damaligen Zeitpunkt noch weitgehend unerforschten Reparaturgen *XRCC4* Mutationen bzw. Polymorphismen zu identifizieren und diagnostische Testverfahren zu etablieren.

4.2.1.1 Methodische Etablierung

Das *XRCC4*-Gen verfügt über sieben kodierende Genabschnitte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Exons 2-8 mittels Sequenzierung zunächst bei neun Patientenproben (A1228–A1236) auf Auffälligkeiten hin untersucht.

Die neun initial untersuchten Patienten wiesen klinischen Symptome des Nijmegen Breakage Syndrom auf (Mikrozephalie, Wachstumsretardierung und zelluläre Strahlensensibilität) (siehe 1.2.7). Es konnte bei Ihnen im Vorfeld meiner Doktorarbeit keine Mutation des *NBS1*-Gens nachgewiesen werden (NBSLD-Patienten, „NBS-like disease“). Mehrere Zelllinien dieser Patienten wurden unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise durch PD Dr. Markus Stumm (Universität Magdeburg), Herrn Prof. Dr. Detlev Schindler (Universität Würzburg), Frau Dr. Corry Weemaes (Universität Rotterdam) und Frau Dr. Raymonda Varon-Mateeva (Universität Berlin) zur Verfügung gestellt.

Anhand der Literatursequenz wurden sieben intronständige Primerpaare festgelegt, welche die Amplifikation jeweils eines Exons mittels PCR ermöglichten. Um ein optimales Ergebnis bei der Polymerasekettenreaktion zu erzielen, wurden Optimierungen bei verschiedenen Annealingtemperaturen durchgeführt. Unter 3.2.2 sind in Tabelle 14 die verwendeten Primerpaare, ihre Nukleotidsequenz, das zugehörige Exon und der optimierte Temperaturbereich angegeben. Es wurden 30-50 µl Ansätze pro Probe zur PCR verwendet (siehe 3.2.2, Tabelle 12). Um bestmögliche Sequenzierungsergebnisse zu erhalten, wurden die PCR-Produkte mittels PEG-Präzipitation (siehe 3.1.3) gereinigt.

In den Exons 2, 5, 6 und 7 waren bei den neun Patienten keine Abweichungen von der Literatursequenz des *XRCC4*-Gens nachweisbar. Dagegen wiesen einige Patienten in den übrigen Exons Genveränderungen auf, welche in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden.

4.2.1.2 Sequenzierung des Exons 3

Im Exon 3 des *XRCC4*-Gens selbst wurden keine Auffälligkeiten gefunden. Es fiel jedoch ein Polymorphismus im Bereich des Introns 3, 76 Nukleotide nach dem Ende der kodierenden Sequenz von Exon 3, auf. Das in der Literatursequenz angegebene Adenin wurde an dieser Stelle durch ein Guanin ersetzt.

Von den neun untersuchten Patienten wiesen sieben (A1228, A1229, A1231, A1232, A1233, A1235, A1236) den Polymorphismus in heterozygoter Ausprägung auf. Ein Patient (A1234) war homozygot für das Guanin-Allel und ein weiterer Patient (A1230) hatte die beiden Adenin-Allele.

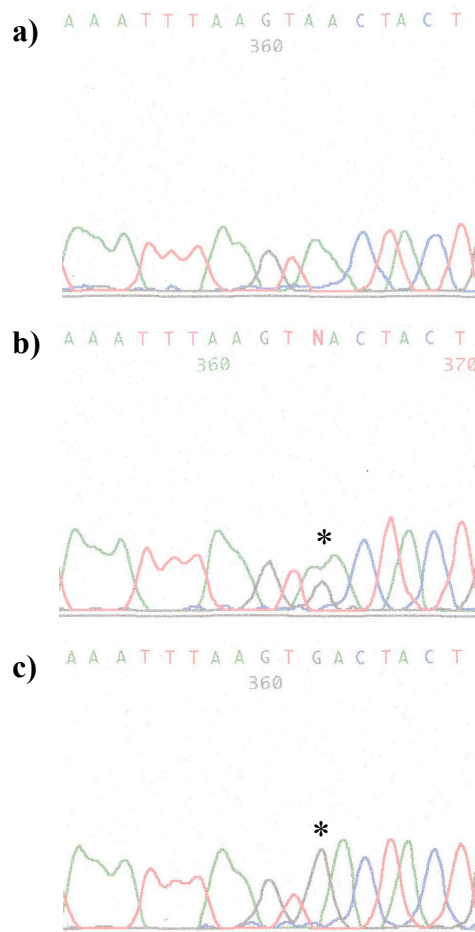


Abbildung 9: Sequenz in Intron 3 (Sinnstrang)

- a) *XRCC4**3+76A/A (Wildtyp, A1230)
- b) *XRCC4**3+76A/G (Heterozygot, A1236)
- c) *XRCC4**3+76G/G (Homozygot, A1234)

Die Markierung (*) zeigt den Polymorphismus *XRCC4**3+76A>G.

4.2.1.3 Sequenzierung des Exons 4/*XRCC4**I134T (c.401T>C)

Bei der Sequenzierung des Exons 4 fiel am 401. Nukleotid der kodierenden Sequenz eine Transition von Thymin zu Cytosin auf. Daraus ergibt sich am 134. Codon bei der Translation eine Aminosäure-Substitution von Isoleucin zu Threonin (AUU→ACU, I134T).

Von neun Patienten waren zwei Patienten (A1233 und A1235) heterozygot für die Substitution I134T. Bei den übrigen sieben Patienten fanden sich keine Auffälligkeiten.

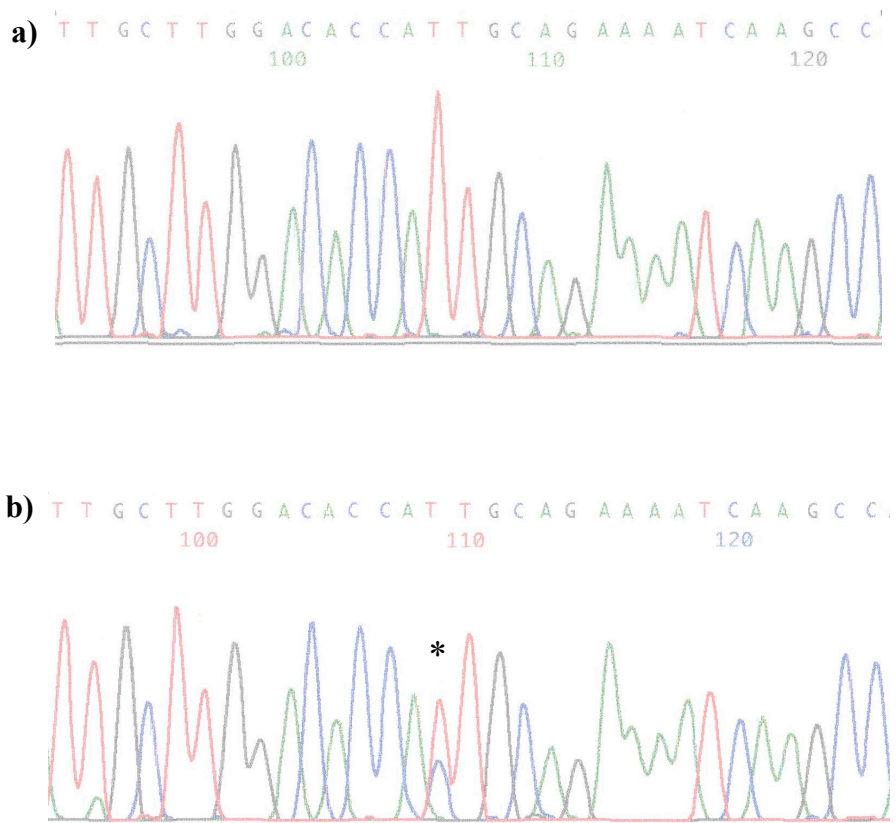


Abbildung 10: Sequenz in Exon 4 (Sinnstrang)

a) *XRCC4**c.401T/T (Wildtyp, A1234)

b) *XRCC4**c.401T/C (Heterozygot, A1233)

Die Markierung (*) zeigt die Substitution *XRCC4**I134T(c.401T>C).

4.2.1.4 Sequenzierung des Exons 8/Spleißmutation IVS7-1G>A

An der Akzeptorspleißstelle des letzten Introns von *XRCC4*, am letzten Nukleotid vor Beginn der kodierenden Sequenz des Exons 8, konnte beim Vergleich mit der Literatursequenz ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin nachgewiesen werden. Eine neue mögliche Akzeptorspleißstelle ist zusammen mit der Substitution *XRCC4**IVS7-1G>A in Abbildung 11 dargestellt.

Von neun Patienten waren zwei Patienten (A1230 und A1233) heterozygot für die Mutation IVS7-1G>A. Bei den übrigen sieben Patienten lag die Wildtyp-Sequenz vor.

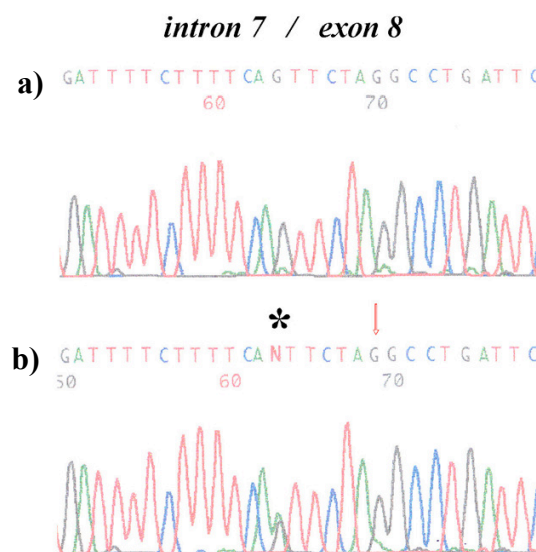


Abbildung 11: Sequenz in Intron7/Exon8 (Sinnstrang)

a) *XRCC4**IVS7-1G/G (Wildtyp, A 1234)

b) *XRCC4**IVS7-1G/A (Heterozygot, A1230)

Die Markierung (*) zeigt die Mutation *XRCC4**IVS7G>A, (↓) zeigt eine neue potentielle Akzeptorspleißstelle.

4.2.1.5 Sequenzierung des Exons 8/Polymorphismus Exon 8 (c.921T>G)

Assoziiert mit der oben beschriebenen Spleißmutation wurde ein weiterer Polymorphismus im 8. Exon von *XRCC4* nachgewiesen. Am 921. Nukleotid der kodierenden Sequenz wiesen beide heterozygoten Träger der Spleißmutation (A1230 und A1233) einen Basenaustausch von Thymin zu Guanin auf. Daraus ergibt sich am Codon 307 bei der Translation keine Veränderung der Aminosäure-Sequenz; beide Codons (UCU→UCC) führen zum Einbau der Aminosäure Serin.

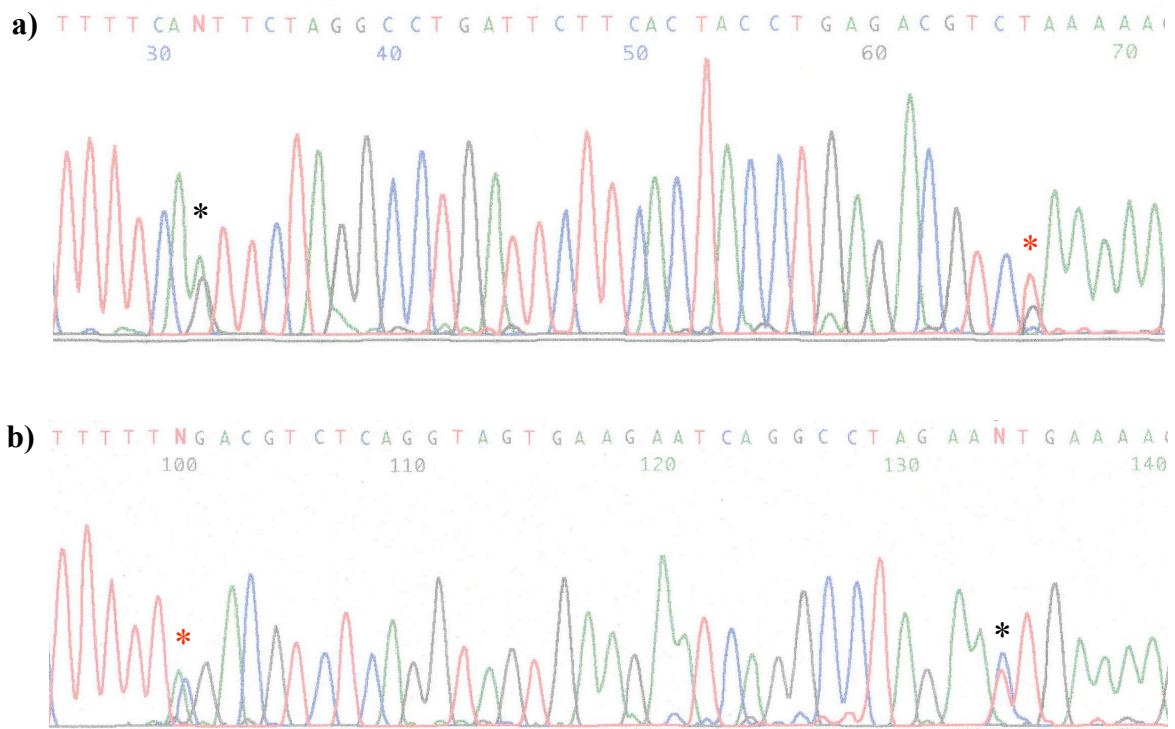


Abbildung 12: Sequenz in Exon 8

a) *XRCC4**IVS7-1G/A, *XRCC4**c.921T/G, A1230, Sinnstrang

b) *XRCC4**IVS7-1G/A, *XRCC4**c.921T/G, A1230, komplementärer Strang

Die Markierung (*) zeigt die Mutation *XRCC4**IVS7G>A, (*) den Polymorphismus *XRCC4**c.921T>G.

4.3 Direkte XRCC4-Mutationsanalyse bei Brustkrebspatientinnen

4.3.1 Direktes Testverfahren für die Substitution XRCC4*I134T (c.401T>C)

Es wurde ein direktes Testverfahren etabliert, mit dem die Variante XRCC4*I134T im Bilateral-Kollektiv und den beiden Kontrollkollektiven überprüft werden konnte.

Die Polymerasekettenreaktion mit den Primern XRCC4-4F und XRCC4-4RR wurde vorab bei Annealingtemperaturen von 55-63 °C optimiert. Die Reaktion wurde danach bei 59 °C unter Standardbedingungen durchgeführt (siehe 3.2.2). Das 239 bp große PCR-Produkt wurde anschließend über Nacht mit *Pst* I restriktionsenzymatisch gespalten (siehe 3.4.2).

Durch die Variante XRCC4*I134T ergibt sich am 401. Nukleotid der kodierenden Sequenz für das Restriktionsenzym *Pst* I eine weitere Erkennungsstelle (5'...CTGCA↓G...3'). Bei homozygoten Allelträgern für XRCC4*I134I sind nach der Inkubation zwei Spaltprodukte von 191 bp und 48 bp Größe nachweisbar. Durch die Variante XRCC4*I134T liegt in der amplifizierten Region eine zweite Schnittstelle für das Enzym vor, welches das 191 bp große Fragment in Sequenzen von 162 bp und 29 bp spaltet.

Die DNA-Fragmente wurden nach der restriktionsenzymatischen Spaltung in einem 3 % Agarosegel in 1 x TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abbildung 13).

Von 120 bilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen wiesen zehn Patientinnen die Variante XRCC4*I134T in heterozygoter Ausprägung auf. Eine homozygote Trägerin konnte nicht nachgewiesen werden. In dem Vergleichskollektiv konnten von 120 unilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen acht heterozygote und eine homozygote Trägerinnen der Substitution identifiziert werden. In der Stichprobe aus der Durchschnittsbevölkerung konnten unter 120 Allelträgern acht heterozygote Träger der Substitution XRCC4*I134T positiv getestet werden; homozygote Träger wurden nicht nachgewiesen.

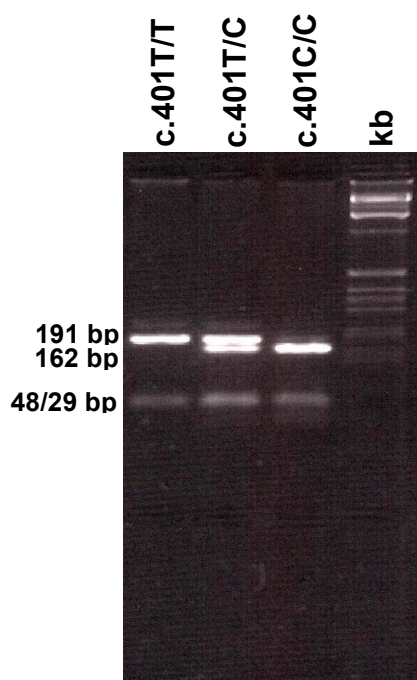


Abbildung 13: Substitution *XRCC4**I134T (c.401T>C) nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit *Pst* I

4.3.2 Direktes Testverfahren für die Spleißmutation *XRCC4**IVS7-1G>A

Um das Bilateral-Kollektiv und die beiden Kontrollkollektive auf die Spleißmutation *XRCC4**IVS7-1G>A hin zu überprüfen, wurde ein spezifisches Testverfahren mit dem Restriktionsenzym *Tsp509* I etabliert. Die Amplifizierung der Proben wurde vorab mit den Primern *XRCC4*-8F und *XRCC4*-8R durchgeführt (siehe 3.2.2). Danach wurde eine restriktionsenzymatische Spaltung gemäß 3.4.2 mit dem Enzym *Tsp509* I (5'...[↓]AATT...3') durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die DNA-Fragmente in einem 2,5 % Agarosegel in 1 x TBE-Puffer elektrophoretisch getrennt (siehe Abbildung 14).

In der restriktionsenzymatischen Spaltung wird das PCR-Produkt des Wildtyp-Allels, welches 247 bp groß ist, nicht gespalten. Durch den Basenaustausch IVS7-1G>A entsteht für das Enzym *Tsp509* I eine neue Erkennungsstelle, so dass das PCR-Produkt in zwei Fragmente mit 162 bp und 85 bp gespalten wird.

Im Kollektiv der 120 bilateral betroffenen Mammakarzinompatientinnen konnten 22 heterozygote Trägerinnen der Spleißmutation IVS7-1G>A identifiziert werden. Bei drei Patientinnen war die Mutation in homozygoter Ausprägung nachweisbar. Innerhalb des Vergleichskollektivs wurden von 120 unilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen 28 heterozygote Trägerinnen und zwei homozygote Trägerinnen detektiert. Im

Vergleichskollektiv aus der Durchschnittsbevölkerung konnten 19 heterozygote Allelträger positiv getestet werden; ein homozygoter Allelträger wurde nicht nachgewiesen.

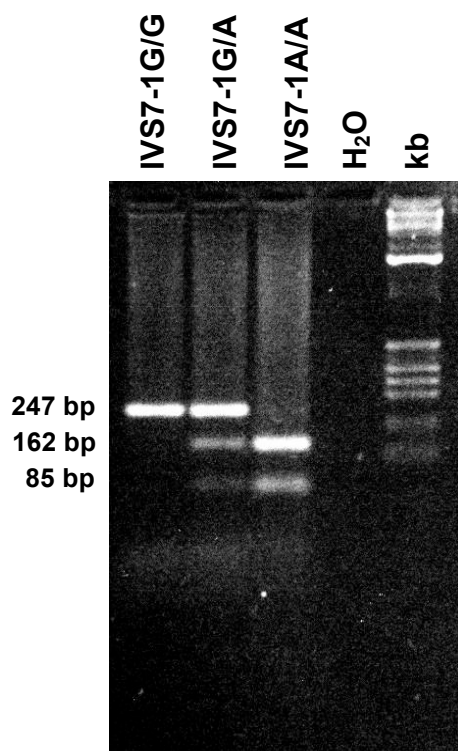


Abbildung 14: Testverfahren für die Spleißmutation nach IVS7-1G>A; Restriktion mit *Tsp509 I*

4.3.3 Direktes Testverfahren für die synonyme Variante in Exon 8, c.921 T>G

Um die Assoziation der synonymen Variante *XRCC4**c.921T>G mit der Spleißmutation IVS7-1G>A zu untersuchen, wurden innerhalb des Bilateral-Kollektivs alle 22 heterozygoten Allelträgerinnen sowie die drei homozygoten Allelträgerinnen für die Spleißmutation auch auf das Vorliegen der Variante c.921T>G hin getestet. Als Kontrolle wurden 28 bilateral betroffene Brustkrebspatientinnen mit Homozygotie für die Wildtyp-Sequenz gewählt. Die Amplifizierung der Proben erfolgte mit den Primern *XRCC4*-8F und *XRCC4*-8R gemäß (3.2.2). Das Testverfahren wurde mit dem Restriktionsenzym *Taq^α I* etabliert (siehe 3.4.2). Die DNA-Fragmente wurden im Anschluss an die restriktionsenzymatische Spaltung in einem 3 % Agarosegel in 1 x TBE-Puffer elektrophoretisch getrennt (Abbildung 15).

Durch den Basenaustausch *XRCC4**c.921T>G entsteht für das Enzym *Taq^α I* eine neue Erkennungs- und Schnittstelle (5'...T[↓]CGA...3'). Das PCR-Produkt des Wildtyp-Allels wird nicht gespalten und ist 247 bp groß. Das PCR-Produkt mit dem Polymorphismus c.921T>G wird in zwei Fragmente mit 128 bp und 119 bp gespalten.

Ein gemeinsames Vorliegen der Variante c.921T>G mit der Spleißmutation IVS7-1G>A konnte bei allen untersuchten Proben bestätigt werden.

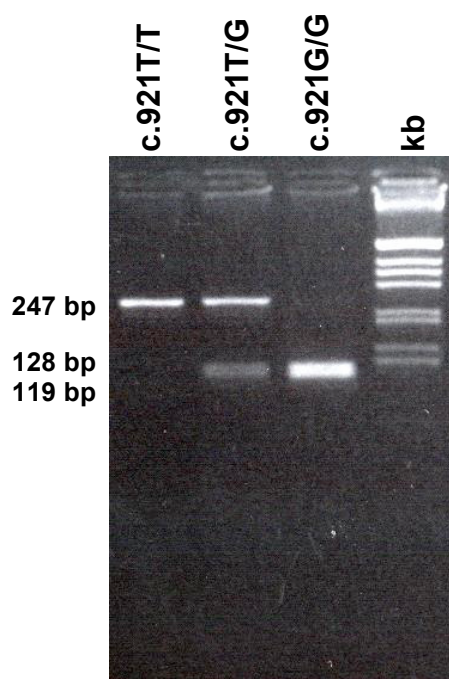


Abbildung 15: Polymorphismus *XRCC4**c.921T>G nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit *Taq^αI*

4.4 Funktionelle Analyse der *RAD51*-Promotorvariante 135 G>C

4.4.1 Einführung

Obwohl alle Zellen das komplette Genom enthalten, nutzen sie nur einen Bruchteil davon. Welche Gene exprimiert werden, d.h. transkribiert und translatiert werden, wird durch Regulationsmechanismen gesteuert. Zu den Regulationsstrukturen zählt die Promotorregion, welche sich am 5'-Ende eines Strukturgens befindet. Die Promotorregion besitzt sowohl Bindungsstellen für die RNA-Polymerase als auch für Transkriptionsfaktoren, welche als Verstärker oder Abschwächer der Transkription wirken können.

Um zu prüfen, ob die *RAD51*-Promotorvariante 135G>C die Expression des Gens verändert, wurden die in den folgenden Abschnitten näher beschriebenen funktionellen Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden lymphoblastoide Zelllinien von zwei heterozygoten Trägerinnen der Variante *RAD51**135G>C angelegt (L290 = B50 und L220 = A597). Als Kontrolle dienten Zelllinien von homozygoten Trägern des Allels *RAD51**135G (L169, L256).

4.4.2 RT-PCR Analyse

Zunächst wurde aus den lymphoblastoiden Zellkulturen RNA isoliert (siehe 3.1.2). Zur Kontrolle wurde ein 2 % Agarosegel mit jeweils 2 µl RNA-Lösung und 2 µl Auftragpuffer

geladen. Nach der RNA-Extraktion waren nach elektrophoretischer Trennung bei allen Zelllinien die spezifischen 16S- und 28S-rRNA Banden sichtbar. Anschließend wurde eine Reverse Transkription (siehe 3.3) durchgeführt. Die gewonnene cDNA stand danach zur weiteren Analyse zur Verfügung.

Die Primeroptimierung mit dem Primerpaar *RAD51*-AF und *RAD51*-2 wurde bei drei Annealingtemperaturen (55 °C, 59 °C und 63 °C) durchgeführt. Die Reaktion lief bei allen gewählten Temperaturen optimal ab. Es wurde daraufhin 59 °C als Annealingtemperatur zur Amplifikation gewählt. Mit dem 235 bp großen RT-PCR-Produkt wurde die, bereits zur direkten Mutationsanalyse der *RAD51*-Promotorvariante 135G>C angewendete, *ScrF* I-Restriktionsspaltung durchgeführt.

Die Abbildung 16 zeigt die elektrophoretische Trennung der RT-PCR-Fragmente im 3 % NuSieve-Agarosegel. Das ungespaltene 235 bp Produkt repräsentiert das *RAD51**135C-Allel, die 162 bp und 73 bp Fragmente liegen beim *RAD51**135G-Allel vor. Anhand der Intensität der Banden ist zu erkennen, dass die Expression der mRNA mit der *RAD51**135G>C-Substitution ca. zwei- bis dreifach gegenüber der Wildtyp-mRNA gesteigert ist.

Eine ca. 2,4-fache Überexpression für *RAD51**135C konnte ebenfalls mittels einer semiquantitativen Gelanalyse mit dem Analyseprogramm Phoretix Grabber v3.01 der Firma Biostep dargestellt werden (siehe Abbildung 17). Mit der RT-PCR Analyse konnte bei allen drei heterozygoten Zelllinien dieser Effekt nachgewiesen werden.

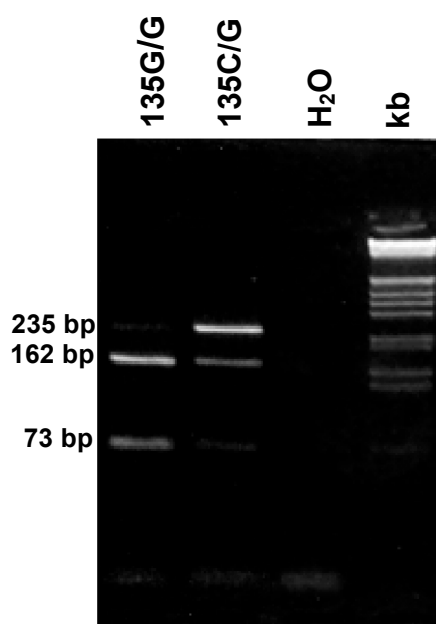


Abbildung 16: RT-PCR-Analyse *RAD51* nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit *ScrF* I

Das ungespaltene Produkt repräsentiert das 135C-Allel.

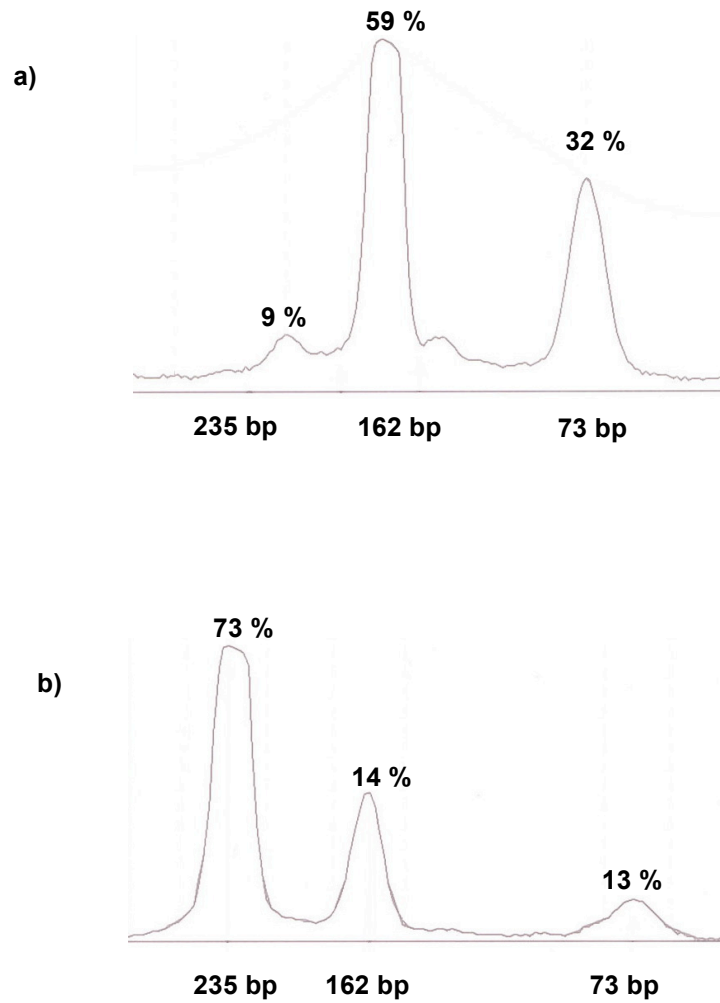


Abbildung 17: Densitometrische Auswertung des Agarosegels mit Analyseprogramm Grabber V3.01

a) Semiquantitative Darstellung RAD51*135G/G; 235bp Bande stellt das ungespaltene RT-PCR-Produkt dar.

b) Semiquantitative Darstellung RAD51*135C/G; ca. 2,4 fach höhere Signalintensität für das 135C-Allel.

4.4.3 Sequenzierung von RT-PCR-Produkten der *RAD51*-Promotorvariante

Durch die Sequenzierung der RT-PCR-Produkte der heterozygoten Trägerinnen und einer Wildtypkontrolle konnte bestätigt werden, dass der Basenaustausch *RAD51**135G>C auch auf mRNA-Ebene vorliegt und dominiert. Die Amplifikation der cDNA wurde mit dem Primerpaar *RAD51*-2 und *RAD51*-AF bei 59 °C durchgeführt. Die weiteren Schritte zur cDNA-Sequenzierung wurden wie unter 3.6.2 beschrieben durchgeführt.

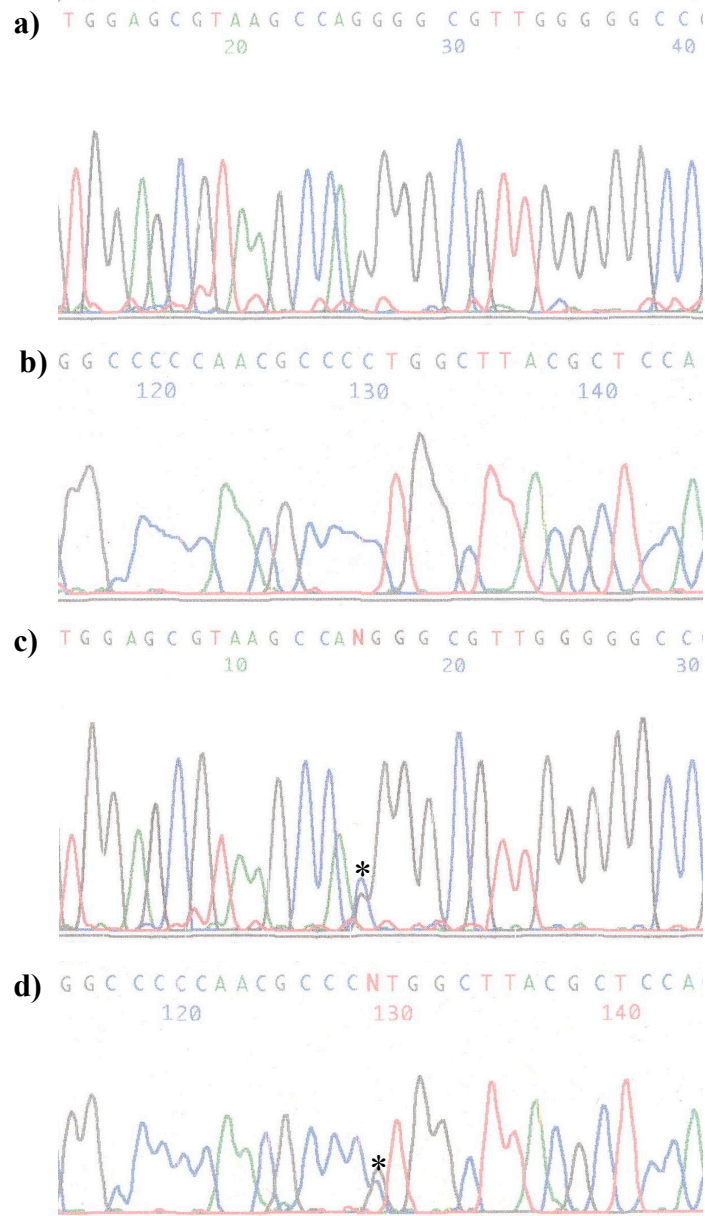


Abbildung 18: Sequenz der *RAD51*-Promotorvariante nach RT-PCR

- a) *RAD51**135G/G, cDNA (Probe A1209), Sinnstrang
- b) *RAD51**135G/G cDNA (Probe A1209), komplementärer Strang
- c) *RAD51**135C/G, cDNA (Probe A995), Sinnstrang
- d) *RAD51**135C/G, cDNA (Probe A995), komplementärer Strang

Die Markierung (*) zeigt Heterozygotie für den *RAD51*-Polymorphismus 135G>C.

4.4.4 Western Blot-Analyse

Im Zusammenhang mit dem Ergebnis der RT-PCR-Analyse wurden im Rahmen dieser Arbeit Western Blot-Analysen durchgeführt mit dem Ziel, die Steigerung der Genexpression durch die *RAD51**135G>C-Substitution auf Proteinebene zu evaluieren.

Aus den angelegten lymphoblastoiden Zelllinien wurde zunächst Protein extrahiert und die Konzentration der Proteinlösung photometrisch bestimmt (siehe 3.10). Bei den Versuchen wurden jeweils 50 µg Protein der Proben aufgetragen. Die gelelektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte in einem 15 % SDS/PAGE-Gel in 1 x GTS-Puffer (siehe 3.5.3). Anschließend wurde ein Western Blot gemäß 3.11.2 durchgeführt.

Im Vergleich zu den beiden Wildtyp-Kontrollen L169 und L256 wurde bei den beiden heterozygoten Trägern des *RAD51**135C-Allels L290 und L220 ca. 2-3 mal mehr RAD51-Protein detektiert (siehe Abbildung 19). Um die gleichmäßige Beladung des Gels zu kontrollieren wurde ebenfalls β-Actin-Protein bestimmt. Als RAD51-Antikörper wurde α-1G8 gewählt. Als β-Actin-Antikörper wurde der Klon AC-15 der Firma Sigma verwendet. Als zweiter Antikörper gegen den α-1G8 und den Klon AC-15 diente ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter polyklonaler anti-Maus-IgG-Antikörper.

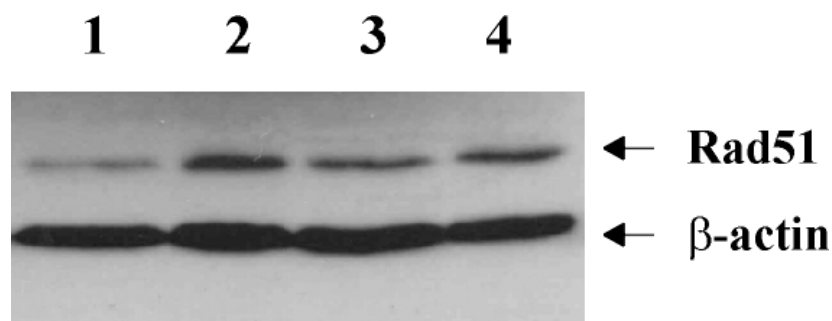


Abbildung 19: Western Blot-Analyse des RAD51-Proteins

Zelllinien heterozygoter Träger des 135C-Allels (2,4) verglichen mit homozygoten 135G-Allelträgern (1,3).

Ca. zwei- bis dreifach erhöhte Expression von RAD51 bei Trägern des 135C-Allels.

RAD51 wurden mit dem monoklonalen Antikörper 1G8 detektiert. β-Actin diente als Ladekontrolle.

4.5 Funktionelle Analyse der Spleißmutation *XRCC4*IVS7-1G>A*

4.5.1 Einführung

Der durch die Spleißmutation *XRCC4*IVS7-1G>A* entstandene Verlust der Akzeptorspleißstelle sollte in funktionellen Analysen auf mRNA- bzw. cDNA-Ebene weiter untersucht werden. Hierfür und für Western Blot Analysen wurden lymphoblastoide Zelllinien von drei homozygoten Allelträgerinnen der Mutation aus dem Kollektiv der bilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen angelegt (L288 = B114, L290 = B50, L291 = B133). Als Kontrollen wurden fünf Zelllinien mit Homozygotie für die Wildtypsequenz von *XRCC4* ausgewählt (L70, L169, L256, L239 und L254). Bei der Zelllinie L239 waren allerdings im Vorfeld dieser Arbeit *RAD50*-Genmutationen, bei den Zelllinien L70 und L254 *ATM*-Genmutationen detektiert worden, so dass diese auch für eine Analyse der ATM- bzw. RAD50-Abhängigkeit der *XRCC4*-Phosphorylierung nach Bestrahlung genutzt werden konnten. Die Linien L169 und L256 stammten von gesunden Personen, bei denen *ATM*-Mutationen ausgeschlossen worden waren. Für die RT-PCR und Fragmentlängenanalyse wurden zudem die Proben einer heterozygoten Allelträgerin (A1209) und einer Trägerinnen beider Wildtypallele (A597) ausgewählt.

4.5.2 Sequenzierung der RT-PCR-Produkte

Zunächst wurde zelluläre RNA aus den angelegten Zelllinien isoliert (siehe 3.1.2) und anschließend durch Reverse Transkription in cDNA umgewandelt (siehe 3.3). Die Primeroptimierung mit dem Primerpaar *XRCC4-7FF* und *XRCC4-8R* wurde bei drei Annealingtemperaturen (55 °C, 59 °C und 63 °C) durchgeführt. Die Reaktion lief bei allen Temperaturen optimal ab. In den weiteren Schritten wurde 59 °C als Annealingtemperatur zur Amplifikation der cDNA gewählt. Es wurden 40 oder 50 µl PCR-Ansätze angewandt (siehe 3.2.2). Die weiteren Schritte zur cDNA-Sequenzierung wurden wie unter 3.6.2 beschrieben durchgeführt.

Durch die Sequenzierung der RT-PCR-Produkte konnte nachgewiesen werden, dass bei homozygoten Allelträgern für die Spleißmutation *IVS7-1G>A*, verglichen mit der Wildtypsequenz, ein Verlust von sechs Basen auf cDNA-Ebene vorliegt.

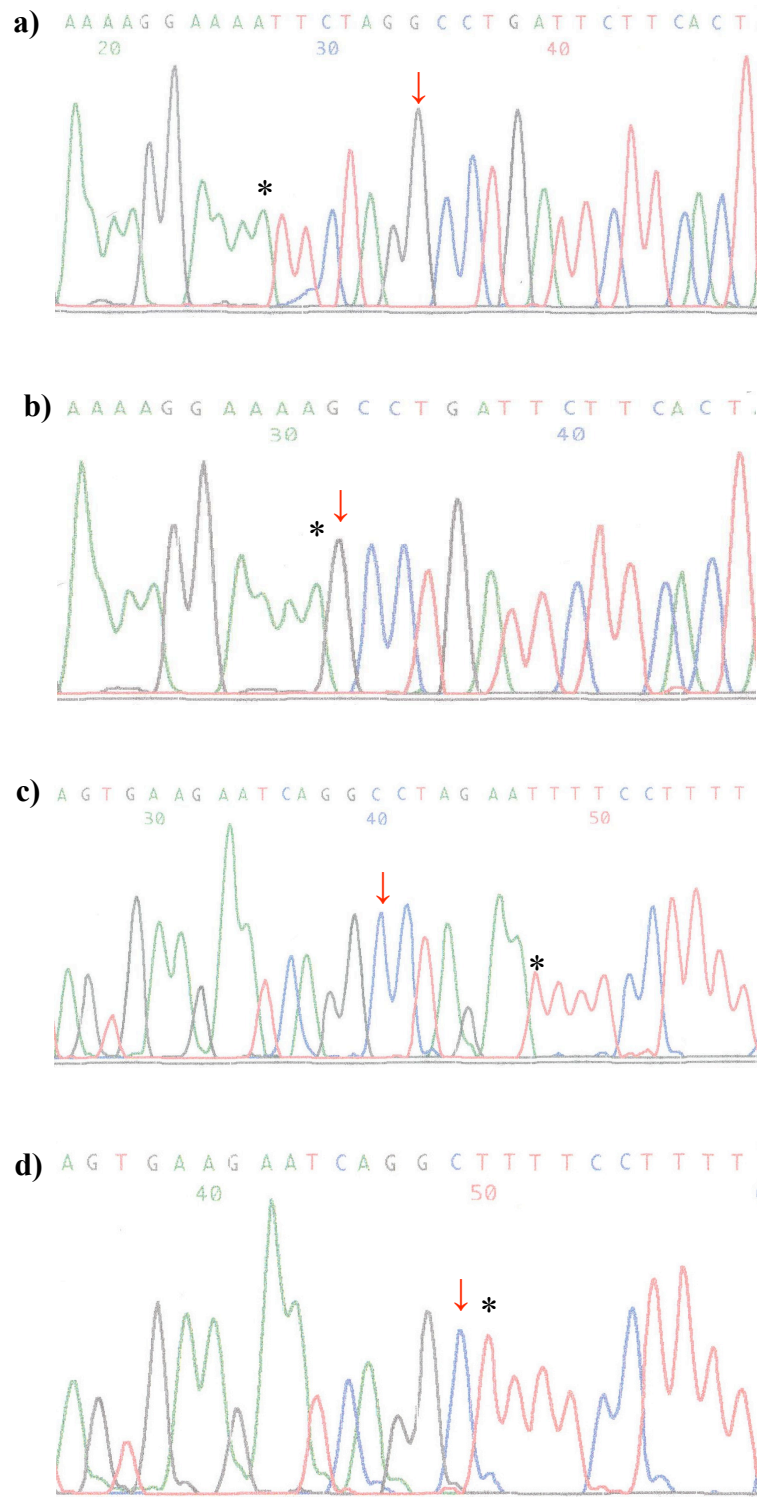


Abbildung 20: Sequenz von Proben mit der Spleißmutation XRCC4*IVS7-1G>A nach RT-PCR

- a) XRCC4*IVS7-1G/G, cDNA, (Kontrolle, A597), Sinnstrang
- b) XRCC4*IVS7-1A/A, cDNA, (B50), Sinnstrang
- c) XRCC4*IVS7-1G/G, cDNA, (Kontrolle, A597), komplementärer Strang
- d) XRCC4*IVS7-1A/A, cDNA, (B50), komplementärer Strang

Die Markierung (*) zeigt das letzte Nukleotid des Exons 7. (↓) zeigt den Verlust von sechs Basen des Exons 8 bei den für IVS7-1G>A homozygoten Allelträgerinnen.

Durch den Basenaustausch wird die Akzeptorspleißstelle offenbar sechs Basen weiter in 5'→3' Richtung verlagert. Durch dieses alternative Spleißen gehen die beiden Aminosäuren Arginin und Serin in Position 298 und 299 verloren. Überdies wird auf Position 300 bei der Translation Asparagin durch Lysin substituiert.

4.5.3 Fragmentlängenanalyse

Das aberrante Spleißen innerhalb des Exon 8 als Folge der Mutation *XRCC4*IVS7-1G>A* konnte durch eine Fragmentlängenanalyse (siehe 3.7) der RT-PCR-Produkte von homozygoten und heterozygoten Allelträgerinnen im Vergleich zu einer Wildtypallelträgerin dargestellt werden (B50, A1209, A597). Hierfür wurde die Amplifikation der cDNA mit dem 6-FAM markierten Primerpaar *XRCC4-7FF* und *XRCC4-8R* bei 59 °C durchgeführt. Die Durchführung der Methode erfolgte gemäß 3.7.2. Abbildung 21 zeigt die der Länge nach getrennten Produkte.

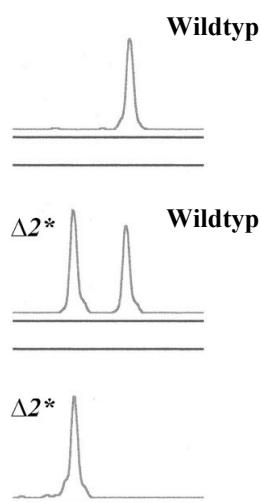


Abbildung 21: Kapillarelektrophoretische Trennung der RT-PCR-Produkte zum quantitativen Nachweis des aberranten Spleißens im Exon 8 bei Trägern der Mutation *IVS7-1G>A*

Oben (A597, homozygot Wildtyp), mitte (A1209, heterozygot, *IVS7-1G>A*), unten (B50, homozygot, *IVS7-1G>A*); $\Delta 2^*$ = Verlust von sechs Basen entsprechend 2 Codons.

In der Fragmentlängenanalyse wurde als Folge des aberranten Spleißens bei der heterozygoten Trägern für die Mutation *XRCC4*IVS7-1G>A* verglichen mit der Trägerin beider Wildtypallele zusätzlich ein um sechs Basenpaare kürzeres RT-PCR-Produkt nachgewiesen. Bei der homozygoten Trägerin war nur die um sechs Basen kürzere Isoform detektierbar.

4.5.4 Strahleninduzierte XRCC4-Phosphorylierung

Um die Phosphorylierung des XRCC4-Proteins, welche zu einem Teil durch DNA-PKcs katalysiert wird, im Rahmen dieser Arbeit zu testen, wurden die lymphoblastoiden Zelllinien mit 40 Gy bestrahlt und anschließend die Zellsuspension auf zwei Ansätze aufgeteilt. Der erste Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der zweite Ansatz wurde einem Lambda-Protein-Phosphatase-Verdau unterzogen (siehe 3.9). Anschließend wurde die Proteinextraktion und –konzentrationsbestimmung gemäß 3.10 durchgeführt. Zusammen mit dem Proteinextrakt aus unbestrahlten Zelllinien wurden die Proben in einer 12,5 % SDS-PAGE getrennt; es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen (siehe 3.5.3). Anschließend konnten durch einen Immunoblot mit dem polyklonalen XRCC4-Antikörper AHP387 die p55-Bande und die p60-Bande des XRCC4-Proteins detektiert werden. Als zweiter Antikörper wurde ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter polyklonaler Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet (siehe 3.11.2).

Es konnte gezeigt werden, dass nach Einwirkung von ionisierender Strahlung (40 Gy) das XRCC4-Protein vorwiegend in seiner phosphorylierten Form p60 vorliegt. Dies galt für die Vergleichslinien L169 und L256 ebenso wie für die RAD50-defiziente Linie L239. Ohne Einwirkung von ionisierender Strahlung oder nach Behandlung mit Lambda-Protein-Phosphatase liegt XRCC4 dagegen in seiner p55-Form vor (siehe Abbildung 22). Dieser Zusammenhang konnte sowohl bei homozygoten Allelträgern für die Spleißmutation IVS7-1G>A als auch bei Trägern beider Wildtypallele nachgewiesen werden. Somit scheint die Spleißmutation IVS7-1G>A keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von XRCC4 auszuüben.

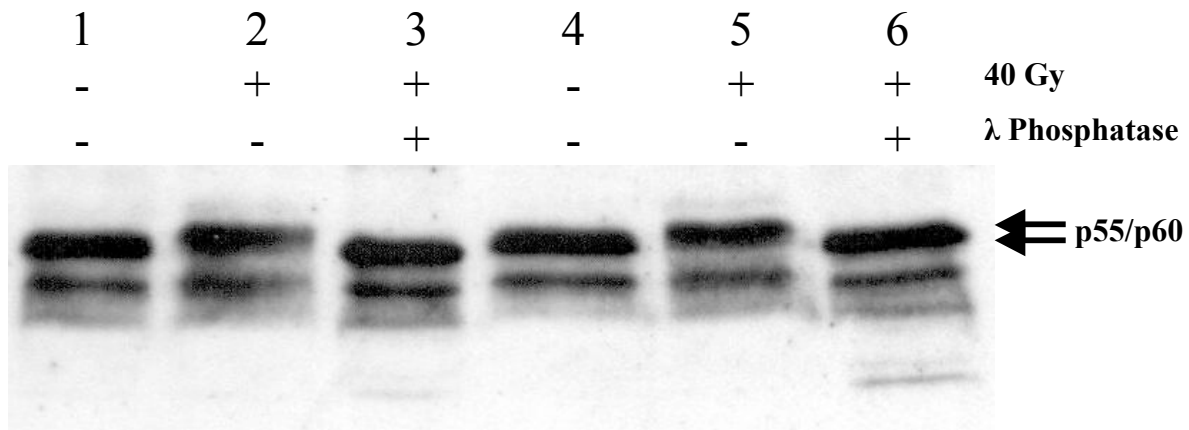


Abbildung 22: Western Blot-Analyse I des XRCC4-Proteins

XRCC4-Protein in seiner phosphorylierten p60 Form (2,5), ohne Einwirkung von ionisierender Strahlung (1,4) und nach Inkubation mit Lambda-Protein-Phosphatase (3,6). 1-3: Probe L290 homozygot IVS7-1A/A; 4-6: Probe L239 Wildtyp IVS7-1G/G. Die Proteine wurden mit dem polyklonalen Antiserum APH387 detektiert.

Auffällig war lediglich, dass die Phospho-Form des XRCC4-Proteins in den beiden untersuchten AT-Zelllinien schwächer vertreten zu sein schien als im Vergleich zu den übrigen Zelllinien. Dies könnte eine ATM-Abhängigkeit der XRCC4-Phosphorylierung vermuten lassen. Ferner wurden in unregelmäßiger Intensität immunreaktive Nebenbanden im Bereich 75 kDa sowie 90-95 kDa nachgewiesen, die unspezifisch sein oder weitere Modifikationen des XRCC4-Proteins anzeigen könnten (siehe Abbildung 23). Diese Fragestellungen werden von unserer Arbeitsgruppe nach Abschluss meiner Arbeit derzeit weiter verfolgt.

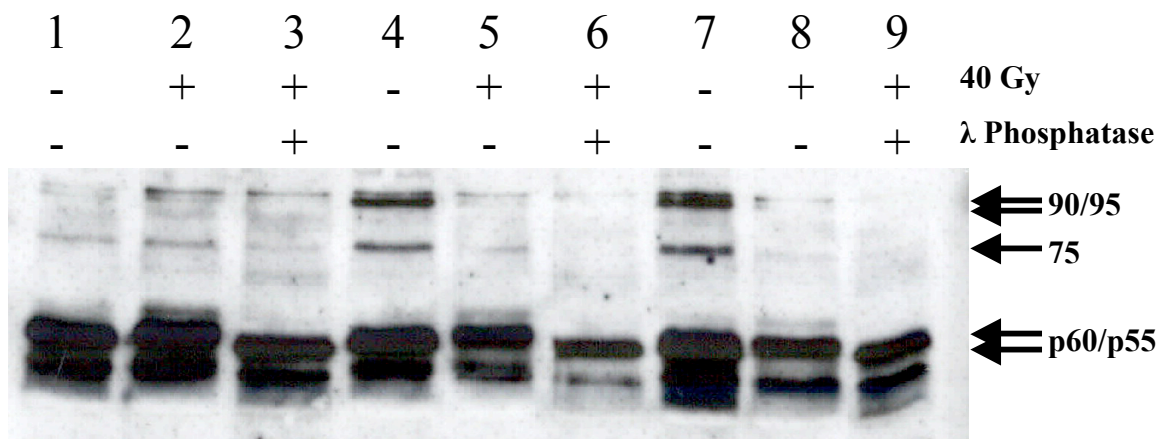


Abbildung 23: Western Blot Analyse II des XRCC4-Proteins

XRCC4-Protein in seiner phosphorylierten p60 Form (2,5,8), ohne Einwirkung von ionisierender Strahlung (1,4,7) und nach Lambda-Protein-Phosphatase Verdau (3,6,9). Gemessen an der Mobilitätsänderung scheint die Phosphorylierung des XRCC4-Proteins bei der AT-Zelllinie schwächer ausgeprägt als bei den übrigen Zelllinien (p60).

1-3: Probe L288 homozygot IVS7-1A/A; 4-6: Probe L291 homozygot IVS7-1A/A; 7-9: Probe L254 homozygot IVS7-1G/G, AT-Zelllinie.

4.6 Zusammenfassung der Allelfrequenzen und klinische Auswertung der untersuchten Polymorphismen und Mutationen

4.6.1 Allelfrequenzen

Bilateral bzw. unilateral betroffene Mammakarzinompatientinnen sowie eine Stichprobe aus der Durchschnittsbevölkerung waren wie in den oberen Abschnitten beschrieben auf fünf Genveränderungen hin analysiert worden. Tabelle 37 stellt diese Genvarianten und ihre Allelfrequenzen in den einzelnen Kollektiven zusammen.

Gen	Exon	Genveränderung	Bilateral betroffene Mammakarzinompatientinnen		Unilateral betroffene Mammakarzinompatientinnen		Durchschnittsbevölkerung	
			Allelfrequenz	Anzahl Homozygote	Allelfrequenz	Anzahl Homozygote	Allelfrequenz	Anzahl Homozygote
RAD51	5'UTR	135G>C	16/240 (6,7 %)	0	20/240 (8,3 %)	4 (1,7 %)	13/240 (5,4 %)	0
XRCC2	2	R188H	17/240 (7,1 %)	1 (0,4 %)	15/240 (6,3 %)	0	19/240 (7,9 %)	0
XRCC3	7	T241M	94/240 (39,2 %)	20 (8,3 %)	100/240 (41,7 %)	20 (8,3 %)	87/240 (36,3 %)	17 (7,1 %)
XRCC4	4	I134T	10/240 (4,2 %)	0	10/240 (4,2 %)	1 (0,4 %)	8/240 (3,3 %)	0
	8	IVS7-1G>A	28/240 (11,7 %)	3 (1,3 %)	32/240 (13,3 %)	2 (0,8 %)	19/240 (7,9 %)	0

Tabelle 37: Zusammenstellung der Allelfrequenzen

Mit dem Pearson-Chi Quadrat Test wurde kontrolliert, ob zwischen den Allelhäufigkeiten in den drei Kollektiven signifikante Unterschiede bestehen (siehe Tabelle 38); es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Allelfrequenzen nachgewiesen werden.

Gen/Exon	Variante	p-Wert		
		Vergleich Bilateral/Unilateral/Kontrolle	Vergleich Bilateral/Kontrolle	Vergleich Unilateral/Kontrolle
RAD51/1	135G>C	0,07	0,13	0,55
XRCC2/2	R188H	0,60	0,46	0,47
XRCC3/7	T241M	0,75	0,41	0,81
XRCC4/4	I134T	0,68	0,61	0,62
XRCC4/8	IVS7-1G>A	0,26	0,11	0,18

Tabelle 38: Signifikanzniveaus (p-Werte) bei Vergleich der Allelhäufigkeiten

4.6.2 Trägerfrequenzen/Odds Ratios

Des Weiteren wurde geprüft, ob die einzelnen Genvarianten mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert sind. Die Berechnung des relativen Risikos (in Form der Odds Ratios) erfolgte anhand von Kreuztabellen. Tabelle 39 zeigt die Odds Ratios (OR) für *jedes* veränderte Allel (Heterozygote und Homozygote) im Vergleich zum Wildtyp. Tabelle 40 zeigt die OR für nur *ein* verändertes Allel (Heterozygotie) im Vergleich zum Wildtyp. Tabelle 41 zeigt die OR für homozygot veränderte Allele im Vergleich zum Wildtyp.

Kollektiv	Gen/Exon	Variante	p	OR	95 % Konfidenzintervall
Bilateral					
	RAD51/1	I35G>C	0,55	1,27	0,58 ; 2,76
	XRCC2/2	R188H	0,58	0,82	0,40 ; 1,68
	XRCC3/7	T241M	0,60	1,15	0,68 ; 1,93
	XRCC4/4	I134T	0,62	1,27	0,48 ; 3,34
	XRCC4/8	IVS7-1G>A	0,32	1,40	0,72 ; 2,70
Unilateral					
	RAD51/1	I35G>C	0,55	1,27	0,58 ; 2,76
	XRCC2/2	R188H	0,46	0,76	0,37 ; 1,58
	XRCC3/7	T241M	0,18	1,43	0,84 ; 2,41
	XRCC4/4	I134T	0,80	1,13	0,42 ; 3,05
	XRCC4/8	IVS7-1G>A	0,08	1,77	0,93 ; 3,36
Bilateral+Unilateral					
	RAD51/1	I35G>C	0,50	1,27	0,64 ; 2,51
	XRCC2/2	R188H	0,45	0,79	0,42 ; 1,46
	XRCC3/7	T241M	0,28	1,28	0,82 ; 2,00
	XRCC4/4	I134T	0,67	1,20	0,51 ; 2,84
	XRCC4/8	IVS7-1G>A	0,12	1,58	0,89 ; 2,81

Tabelle 39: Odds Ratios für *jedes* veränderte Allel im Vergleich zum Wildtyp

Kollektiv	Gen/Exon	Variante	p	OR	95 % Konfidenzintervall
Bilateral					
	RAD51/1	135G>C	0,55	1,27	0,58 ; 2,76
	XRCC2/2	R188H	0,47	0,77	0,37 ; 1,59
	XRCC3/7	T241M	0,72	1,11	0,64 ; 1,92
	XRCC4/4	I134T	0,62	1,27	0,48 ; 3,34
	XRCC4/8	IVS7-1G>A	0,55	1,23	0,63 ; 2,42
Unilateral					
	RAD51/1	135G>C	0,90	0,95	0,41 ; 2,18
	XRCC2/2	R188H	0,46	0,76	0,37 ; 1,58
	XRCC3/7	T241M	0,22	1,41	0,81 ; 2,47
	XRCC4/4	I134T	0,99	1,01	0,37 ; 2,78
	XRCC4/8	IVS7-1G>A	0,13	1,65	0,86 ; 3,16
Bilateral+Unilateral					
	RAD51/1	135G>C	0,77	1,11	0,55 ; 2,23
	XRCC2/2	R188H	0,39	0,76	0,41 ; 1,42
	XRCC3/7	T241M	0,36	1,25	0,78 ; 2,02
	XRCC4/4	I134T	0,77	1,14	0,48 ; 2,70
	XRCC4/8	IVS7-1G>A	0,22	1,44	0,80 ; 2,57

Tabelle 40: Odds Ratios für *ein* verändertes Allel im Vergleich zum Wildtyp

Kollektiv	Gen/Exon	Variante	p	OR	95 % Konfidenzintervall
Bilateral					
	RAD51/1	135G>C	/	/	/
	XRCC2/2	R188H	/	/	/
	XRCC3/7	T241M	0,53	1,28	0,60 ; 2,74
	XRCC4/4	I134T	/	/	/
	XRCC4/8	IVS7-1G>A	/	/	/
Unilateral					
	RAD51/1	135G>C	/	/	/
	XRCC2/2	R188H	/	/	/
	XRCC3/7	T241M	0,32	1,47	0,68 ; 3,17
	XRCC4/4	I134T	/	/	/
	XRCC4/8	IVS7-1G>A	/	/	/
Bilateral+Unilateral					
	RAD51/1	135G>C	/	/	/
	XRCC2/2	R188H	/	/	/
	XRCC3/7	T241M	0,36	1,37	0,70 ; 2,66
	XRCC4/4	I134T	/	/	/
	XRCC4/8	IVS7-1G>A	/	/	/

Tabelle 41: Odds Ratios für *Homozygotie* im Vergleich zum Wildtyp

Sowohl im Bilateral- als auch im Unilateral-Kollektiv konnte für keine der fünf getesteten Genvarianten ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms nachgewiesen werden. Ein Trend im Hinblick auf ein erhöhtes Brustkrebsrisiko unilateral erkrankter Patientinnen ergab sich für die *XRCC4*-Spleißmutation IVS7-1G>A ($p = 0,08$) (siehe Tabelle 39). Der seltene homozygote Genotyp konnte nur für die Variante *XRCC3**T241M im Hinblick auf ein erhöhtes Brustkrebsrisiko getestet werden, da für die übrigen untersuchten Polymorphismen keine Homozygotie für das jeweils seltene Allel in dem Kontrollkollektiv aus der Durchschnittsbevölkerung bestand. Für homozygote Trägerinnen des *XRCC3**241M-Allels konnte kein Hinweis auf ein erhöhtes Brustkrebsrisiko nachgewiesen werden.

4.6.3 Klinisch-Statistische Auswertung

In den folgenden Abschnitten wurde in einer „case-only“-Analyse untersucht, ob die identifizierten Polymorphismen bzw. Varianten einen signifikanten Einfluss auf bestimmte klinische Charakteristika haben. Leider waren nicht bei allen 120 untersuchten Patientinnen des Bilateral- und Unilateral-Kollektivs die klinischen Daten verfügbar. Die nachfolgenden statistischen Berechnungen beziehen sich auf die zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Daten.

4.6.3.1 Einfluss auf den Lymphknotenstatus

Es wurde untersucht, ob eine Trägerschaft für die jeweilige Genvariante den Lymphknotenstatus beeinflusst. Geprüft werden sollte hierbei, ob durch jedes veränderte Allel der einzelnen Varianten häufiger bzw. seltener Lymphknotenmetastasen auftraten als bei Patientinnen mit beiden Wildtypallelen. Fälle von *Carcinomata in situ* (Tis) gemäß dem Tumorstadium wurden nicht in die Berechnung einbezogen (siehe Tabelle 1). Im Unilateral-Kollektiv war für einen Fall mit *Carcinoma in situ* (Tis) kein Nodalstadium dokumentiert worden, dieser Fall wurde ebenfalls nicht betrachtet. Zur Berechnung wurde der Pearson Chi-Quadrat-Test gewählt (siehe Tabelle 42).

Kollektiv	Tumor	Genvariante	Hetero+Homo		Wildtyp		Chi ²	p
			Lymphknotenstatus		Lymphknotenstatus			
			pos	neg	pos	neg		
Bilateral	TU1	<i>RAD51</i> *135G>C	5	7	30	59	0,30	0,59
		<i>XRCC2</i> *R188H	2	12	33	54	2,98	0,08
		<i>XRCC3</i> *T241M	21	43	14	23	0,26	0,61
		<i>XRCC4</i> *I134T	1	8	34	58	2,42	0,12
		<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	8	13	27	53	0,14	0,71
Bilateral	TU2	<i>RAD51</i> *135G>C	2	14	29	68	2,09	0,15
		<i>XRCC2</i> *R188H	3	12	28	70	0,48	0,49
		<i>XRCC3</i> *T241M	15	55	16	27	3,33	0,07
		<i>XRCC4</i> *I134T	3	6	28	76	0,17	0,68
		<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	8	16	23	66	0,53	0,47
Unilateral		<i>RAD51</i> *135G>C	5	11	41	56	0,69	0,41
		<i>XRCC2</i> *R188H	6	8	40	59	0,03	0,86
		<i>XRCC3</i> *T241M	31	45	15	22	<0,01	0,98
		<i>XRCC4</i> *I134T	4	4	42	63	0,31	0,58
		<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	9	19	37	48	1,13	0,29

Tabelle 42: Einfluss der Genvarianten auf den LK-Status

Es konnte kein Nachweis auf einen signifikanten Einfluss der fünf geprüften Varianten auf den Lymphknotenstatus erbracht werden. Im Fall der Mutation *XRCC2**R188H lag ein Trend zu einer niedrigeren Rate an Lymphknotenmetastasen beim Ersttumor der bilateral betroffenen Patientinnen vor ($p = 0,08$). Allerdings konnten bei 15 Patientinnen dieses Kollektivs keine Angaben über den Lymphknotenstatus gemacht werden. Beim Zweitumor und im unilateralen Brustkrebskollektiv war dieser Effekt der *XRCC2*-Mutation R188H nicht nachweisbar. Die Mutation *XRCC3**T241M zeigte ebenfalls einen Trend hin zu einem eher protektiven Effekt im Hinblick auf Lymphknotenmetastasen beim Zweitumor bilateral betroffener Brustkrebspatientinnen ($p = 0,07$). Beim Ersttumor und im Unilateral-Kollektiv konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

4.6.3.2 Grading invasiv duktaler Mammakarzinome

Der histologisch invasiv duktale Typ des Mammakarzinoms war am häufigsten bei beiden Brustkrebskollektiven vertreten. Im Bilateral-Kollektiv waren 74 Ersttumoren und 80 Zweitumoren als histologisch invasiv duktal eingestuft worden. Im Unilateral-Kollektiv wurden 86 invasiv duktale Tumoren identifiziert. Hierunter war bei acht Ersttumoren und

zwei Zweittumoren des Bilateral-Kollektivs sowie drei Tumoren aus dem Unilateral-Kollektive keine Information bezüglich des Gradings vorhanden. Es wurde untersucht, ob das histologische Grading durch eine der identifizierten Genvarianten, in Richtung höheren oder niedrigeren Gradings, beeinflusst wird. Verglichen wurden jeweils Patientinnen mit beiden Wildtypallelen und Patientinnen mit mindestens einem veränderten Allel (Heterozygot und Homozygot). Zur Berechnung wurde die lineare Assoziation („linear-by-linear-association“) gewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 43 dargestellt.

Kollektiv/TU	Genvariante	Hetero- +Homozygot			Wildtyp			Chi ²	p
		Grading			Grading				
		I	II	III	I	II	III		
Bilat./TU1	<i>RAD51*135G>C</i>	0	4	5	5	30	22	1,36	0,24
	<i>XRCC2*R188H</i>	0	7	4	5	27	23	0,03	0,86
	<i>XRCC3*T241M</i>	3	18	19	2	16	8	1,19	0,28
	<i>XRCC4*I134T</i>	1	4	2	4	30	25	0,75	0,39
	<i>XRCC4*IVS7-1G>A</i>	1	8	9	4	26	18	0,81	0,37
Bilat./TU2	<i>RAD51*135G>C</i>	1	5	6	1	36	29	<0,01	0,96
	<i>XRCC2*R188H</i>	0	6	5	2	35	30	0,04	0,84
	<i>XRCC3*T241M</i>	2	27	20	0	14	15	1,37	0,24
	<i>XRCC4*I134T</i>	0	3	3	2	38	32	0,13	0,72
	<i>XRCC4*IVS7-1G>A</i>	0	8	10	2	33	25	1,37	0,24
Unilat.	<i>RAD51*135G>C</i>	0	10	3	4	40	26	0,25	0,62
	<i>XRCC2*R188H</i>	1	5	4	3	45	25	<0,01	0,99
	<i>XRCC3*T241M</i>	3	32	22	1	18	7	0,60	0,44
	<i>XRCC4*I134T</i>	0	4	1	4	46	28	0,18	0,68
	<i>XRCC4*IVS7-1G>A</i>	1	10	10	3	40	19	1,47	0,23

Tabelle 43: Einfluss der Genvarianten auf das Grading histol. invasiv duktaler Mammakarzinome

In beiden Brustkrebskollektiven wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich des Gradings invasiv duktaler Mammakarzinome für alle untersuchten Genvarianten im Vergleich zu Patientinnen mit beiden Wildtypallelen gefunden.

4.6.3.3 Tumorstadium

Es wurde untersucht, ob die identifizierten Genvarianten das Tumorstadium des Mammakarzinoms signifikant beeinflussen. Geprüft werden sollte, ob bei Trägerinnen der entsprechenden Genvariante ein Trend zu einem höheren Tumorstadium (T0-T4) vorlag im Vergleich zu Patientinnen mit beiden Wildtypallelen. Zur Berechnung wurde die lineare Assoziation („linear-by-linear-association“) gewählt. Tabelle 44 zeigt eine Übersicht.

Kollek./TU	Genvariante	Hetero-+Homozygot					Wildtyp					Chi ²	p
		Tumorstadium					Tumorstadium						
		T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4		
Bilat./TU1	<i>RAD51*135G>C</i>	1	7	3	2	0	3	56	22	4	6	0,02	0,90
	<i>XRCC2*R188H</i>	1	9	4	0	1	3	54	21	6	5	0,18	0,67
	<i>XRCC3*T241M</i>	3	39	14	5	4	1	24	11	1	2	0,06	0,80
	<i>XRCC4*I134T</i>	0	6	2	0	1	4	57	23	6	5	0,05	0,82
	<i>XRCC4*IVS7-1G>A</i>	0	14	4	1	2	4	49	21	5	4	0,22	0,64
Bilat./TU2	<i>RAD51*135G>C</i>	0	12	2	0	2	7	63	30	3	1	0,94	0,33
	<i>XRCC2*R188H</i>	1	10	4	1	0	6	65	28	2	3	0,02	0,90
	<i>XRCC3*T241M</i>	4	50	19	1	0	3	25	13	2	3	3,81	0,05
	<i>XRCC4*I134T</i>	1	8	1	0	0	6	67	31	3	3	2,23	0,13
	<i>XRCC4*IVS7-1G>A</i>	1	18	4	1	1	6	57	28	2	2	0,01	0,92
Unilat.	<i>RAD51*135G>C</i>	0	11	3	0	2	4	57	34	6	2	0,21	0,65
	<i>XRCC2*R188H</i>	0	9	4	1	0	4	59	33	5	4	0,07	0,80
	<i>XRCC3*T241M</i>	2	43	29	4	2	2	25	8	2	2	0,44	0,51
	<i>XRCC4*I134T</i>	1	6	2	0	0	3	62	35	6	4	2,11	0,15
	<i>XRCC4*IVS7-1G>A</i>	0	16	12	0	1	4	52	25	6	3	0,09	0,76

Tabelle 44: Einfluss der Genvarianten auf das Tumorstadium des Mammakarzinoms

Im Bilateral-Kollektiv konnte beim Zweittumor der Patientinnen mit mindestens einem veränderten Allel für die Mutation *XRCC3*T241M* im Vergleich zum Genotyp mit beiden Wildtypallelen ein Trend hin zu einem höheren Tumorstadium aufgezeigt werden ($p = 0,05$). Beim Ersttumor und im Unilateral-Kollektiv lag dieser Trend nicht vor. Für die übrigen identifizierten Genvarianten wurde in beiden Brustkrebskollektiven kein signifikanter Unterschied bezüglich des Tumorstadiums der Mammakarzinome im Vergleich zu Patientinnen mit beiden Wildtypallelen nachgewiesen.

4.6.3.4 Fernmetastasierung

Es wurde geprüft, ob bei den identifizierten Genvarianten ein signifikanter Unterschied bezüglich des Bestehens einer Fernmetastasierung vorlag. Untersucht wurde dieser Unterschied, sofern Angaben über eine mögliche Fernmetastasierung vorlagen, bei Allelträgern der entsprechenden Genvariante im Vergleich zu Patientinnen mit beiden Wildtypallelen. Drei Patientinnen mit duktalem *Carcinoma in situ* aus dem Unilateral-Kollektiv wurden von der Betrachtung ausgeschlossen. Bei einer vierten unilateral betroffenen Patientin, bei der ebenfalls gemäß dem Tumorstadium ein *Carcinoma in situ* (Tis) dokumentiert war, waren keine Angaben zu Histologie und Fernmetastasierung vorhanden. Im Bilateral-Kollektiv wurde eine Patientin, deren Zweitumor histologisch als duktales *Carcinoma in situ* eingestuft worden war und bei der keine histologischen Angaben zu dem Ersttumor vorlagen, von der Betrachtungen ausgeschlossen. Bei allen weiteren bilateral betroffenen Patientinnen war mindestens ein Tumor als invasiv eingestuft worden. Zur Berechnung wurde der Pearson Chi-Quadrat-Test gewählt. Tabelle 45 veranschaulicht die Ergebnisse.

Kollektiv	Genvariante	Hetero- +Homozygot		Wildtyp		Chi ²	p
		Fernmetastasen		Fernmetastasen			
		neg	pos	neg	pos		
Bilateral	<i>RAD51</i> *135G>C	12	4	84	19	0,38	0,54
	<i>XRCC2</i> *R188H	13	3	83	20	<0,01	0,95
	<i>XRCC3</i> *T241M	58	16	38	7	0,66	0,42
	<i>XRCC4</i> *I134T	9	1	87	22	0,61	0,44
	<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	17	8	79	15	3,26	0,07
Unilateral	<i>RAD51</i> *135G>C	14	2	84	14	0,04	0,85
	<i>XRCC2</i> *R188H	9	5	89	11	6,22	0,01
	<i>XRCC3</i> *T241M	66	11	32	5	0,01	0,91
	<i>XRCC4</i> *I134T	8	0	90	16	1,40	0,24
	<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	20	9	78	7	9,32	<0,01

Tabelle 45: Einfluss der Genvarianten auf den Fernmetastasenstatus

Im Unilateral-Kollektiv konnte bei den Mutationen *XRCC2**R188H und *XRCC4**IVS7-1G>A ein höherer Anteil an Fernmetastasen bei Patientinnen mit mindestens einem veränderten Allel, verglichen mit Trägerinnen beider Wildtypallele, nachgewiesen werden ($p = 0,01$ und $p = <0,01$). Beide Mutationen würden demnach für das Entstehen von Fernmetastasen disponieren. Bei der Spleißmutation IVS7-1G>A war dieser Unterschied ebenfalls im Bilateral-Kollektiv zu beobachten ($p = 0,07$), während sich bei der Variante *XRCC2**R188H dieser Zusammenhang im Bilateral-Kollektiv nicht bestätigte. Bei den übrigen untersuchten Genvarianten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

4.6.3.5 Mittleres Alter bei Erstdiagnose

Es wurde geprüft, ob bei den identifizierten Genvarianten ein signifikanter Altersunterschied bei Erstdiagnose des Tumors vorlag. Untersucht wurde dieser Unterschied bei Mutationsträgerinnen der entsprechenden Genvariante im Vergleich zu Patientinnen mit beiden Wildtypallelen. Zur Berechnung wurde der T-Test gewählt (siehe Tabelle 46).

Kollektiv/TU	Genvariante	Wildtyp	Hetero +Homozygot	t-Wert	p	95 % K.-Intervall
		Alter ED	Alter ED			
Bilat./TU1	<i>RAD51</i> *135G>C	54,6	54,9	-0,10	0,92	-6,86; 6,18
	<i>XRCC2</i> *R188H	54,8	53,4	0,42	0,67	-5,13; 7,91
	<i>XRCC3</i> *T241M	53,3	55,5	-0,98	0,33	-6,78; 2,30
	<i>XRCC4</i> *I134T	54,1	60,2	-1,51	0,13	-14,01; 1,88
	<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	55,8	50,4	1,99	0,05	0,04; 10,78
Bilat./TU2	<i>RAD51</i> *135G>C	60,9	59,5	0,46	0,65	-4,68; 7,49
	<i>XRCC2</i> *R188H	60,9	59,2	0,57	0,57	-4,32; 7,85
	<i>XRCC3</i> *T241M	62,3	59,7	1,19	0,24	-1,70; 6,77
	<i>XRCC4</i> *I134T	60,3	64,9	-1,21	0,23	-12,01; 2,88
	<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	61,7	56,8	1,95	0,05	-0,072; 9,97
Unilat.	<i>RAD51</i> *135G>C	59,2	63,8	-1,57	0,12	-10,39; 1,20
	<i>XRCC2</i> *R188H	60,2	57,0	1,07	0,29	-2,75; 9,23
	<i>XRCC3</i> *T241M	62,0	58,8	1,52	0,13	-0,97; 7,39
	<i>XRCC4</i> *I134T	59,7	61,3	-0,42	0,67	-9,17; 5,93
	<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	60,7	57,4	1,43	0,16	-1,27; 7,85
Bilat./TU2+Unilat.	<i>RAD51</i> *135G>C	60,1	61,7	0,75	0,45	-2,59; 5,78
	<i>XRCC2</i> *R188H	60,6	58,1	1,15	0,25	-1,77; 6,70
	<i>XRCC3</i> *T241M	62,1	59,2	1,94	0,05	-0,04; 5,85
	<i>XRCC4</i> *I134T	60,0	63,21	1,19	0,23	-2,07; 8,45
	<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	61,2	57,1	2,42	0,02	0,76; 7,45

Tabelle 46: Genvarianten und deren Assoziation zum mittleren Alter bei Erstdiagnose

Im Bilateral-Kollektiv war bei der Spleißmutation *XRCC4*IVS7-1G>A* ein Unterschied bezüglich des mittleren Alters bei Erstdiagnose des Ersttumors erkennbar. Hetero- und homozygote Allelträgerinnen erkrankten im Vergleich zu Trägerinnen beider Wildtypallele früher ($p = 0,05$). Dieser Unterschied war bei Diagnose des Zweitumors der bilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen ebenfalls erkennbar ($p = 0,05$); bei den unilateral betroffenen Patientinnen zeigte sich ebenfalls ein geringfügig jüngeres Alter bei Erstdiagnose ($p = 0,16$). Im Vergleich aller Trägerinnen der Spleißmutation *XRCC4*IVS7-1G>A* und Trägerinnen beider Wildtypallele war dieser Altersunterschied noch deutlicher nachweisbar ($p = 0,02$). Ein Trend im Hinblick auf ein geringfügig jüngeres Erkrankungsalter ergab sich auch für alle Trägerinnen der Variante *XRCC3*T214M* im Vergleich zu Trägerinnen beider Wildtypallele ($p = 0,05$). Bei den übrigen untersuchten Genvarianten konnte kein Zusammenhang zwischen dem Alter bei Erstdiagnose des Tumors und dem Genotyp nachgewiesen werden.

4.6.3.6 Familienanamnese

Es wurde ferner untersucht, ob bei Trägerinnen der entsprechenden Genvariante im Vergleich zu Patientinnen mit beiden Wildtypallelen ein signifikanter Unterschied in Bezug auf eine positive Familienanamnese nachzuweisen war. Als positive Familienanamnese wurde gewertet, wenn mindestens eine Verwandte ersten oder zweiten Grades bereits an einem Mammakarzinom erkrankt war. Zur Berechnung wurde der Pearson Chi-Quadrat-Test gewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 47 dargestellt.

Kollektiv	Genvariante	Hetero-+Homozygot		Wildtyp		Chi ²	p
		Familienanamnese		Familienanamnese			
		neg	pos	neg	pos		
Bilat.	<i>RAD51</i> *135G>C	11	5	76	28	0,13	0,72
	<i>XRCC2</i> *R188H	14	2	73	31	2,08	0,15
	<i>XRCC3</i> *T241M	55	19	32	14	0,32	0,57
	<i>XRCC4</i> *I134T	8	2	79	31	0,31	0,58
	<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	18	7	69	26	<0,01	0,95
Unilat.	<i>RAD51</i> *135G>C	11	5	76	28	0,13	0,72
	<i>XRCC2</i> *R188H	12	3	75	30	0,48	0,49
	<i>XRCC3</i> *T241M	54	26	33	7	3,01	0,08
	<i>XRCC4</i> *I134T	5	4	82	29	1,40	0,24
	<i>XRCC4</i> *IVS7-1G>A	18	12	69	21	3,13	0,08

Tabelle 47: Assoziation der Genvarianten zur Familienanamnese

Im Unilateral-Kollektiv war bei den Mutationen *XRCC3**T241M und *XRCC4**IVS7-1G>A ein Trend hin zu einer positiven Familienanamnese für die Hetero- und Homozygoten Allelträgerinnen auffällig (p = 0,08 und p = 0,08). Bei den bilateral betroffenen Patientinnen zeigte sich dieser Trend für beide Varianten nicht. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Häufigkeiten von positiver und negativer Familienanamnese bei hetero- und homozygoten Allelträgerinnen im Vergleich zu Trägerinnen beider Wildtypallele konnte jedoch bei keiner der untersuchten Genvarianten nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der *RAD51*135G>C*-Promotorvariante

Ausgangspunkt der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Promotorvariante *RAD51*135G>C* waren Studien von Wang et al. (2001) und Levy-Lahad et al. (2001). Wang et al. (2001) berichteten über die Identifizierung von zwei „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs), *RAD51*135G>C* und *RAD51*172G>T*, in der Promotorregion des Gens. Es wurde vermutet, dass beide Polymorphismen in einem Kopplungsungleichgewicht zueinander stünden. Die von mir durchgeführten Sequenzierungen bestätigten diese Vermutung, denn alle homozygoten Allelträger für *RAD51*135C* waren ebenso homozygote Allelträger für *RAD51*172G*.

Wang et al. (2001) wiesen bei 216 *BRCA2*-Mutationsträgerinnen eine signifikante Assoziation der Variante *RAD51*135G>C* mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko nach (OR 3,2; 95 % KI 1,4-40; $p = 0,01$). Innerhalb einer Gruppe von 466 *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutationsträgerinnen war jedoch die Häufigkeit des *RAD51*135C*-Allels nur leicht bei Brustkrebspatientinnen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (12 % vs. 10 %; $p = 0,3$).

Eine Studie von Levy-Lahad et al. (2001) bestätigte die Assoziation von *RAD51*135C*-Allelträgern bei *BRCA2*-Mutationsträgerinnen (6174delT) mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko (HR 3,46; 95 % KI 1,3-9,2; $p = 0,01$). Bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (185delAG, 5382insC) konnte für das *RAD51*135C*-Allel kein Einfluss auf das Brustkrebsrisiko nachgewiesen werden. In einer späteren Studie von Jakubowska et al. (2003) wurde vermutet, dass die Promotorvariante *RAD51*135G>C* bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (5382insC) sogar einen protektiven Effekt auf die Entstehung von Brustkrebs aufweise. Hierzu wurden 83 Paare von erkrankten und nicht erkrankten 5382insC-Mutationsträgerinnen untersucht. Das *RAD51*135C*-Allel konnte in 37 % (31 von 83) bei nichterkrankten und in nur 17 % (14 von 83) der erkrankten 5382insC-Mutationsträger nachgewiesen werden. In Betracht gezogen werden muss jedoch, dass die Allelfrequenz des *RAD51*135C*-Allels auch innerhalb der polnischen Durchschnittsbevölkerung gegenüber der von Wang et al. (2001) untersuchten Allelfrequenz der australischen Durchschnittsbevölkerung erhöht ist (26 % vs. 12 %).

In meiner Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob der *RAD51*-Polymorphismus 135G>C unabhängig von dem *BRCA1*- oder *BRCA2*-Status das Brustkrebsrisiko des bilateralen und unilateralen Mammakarzinoms beeinflusst.

Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Allelfrequenzen der Variante *RAD51**135G>C bei 120 bilateral und 120 unilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu einer Stichprobe aus der Durchschnittsbevölkerung nachgewiesen werden (siehe Tabelle 38). Auffällig war jedoch die Tatsache, dass lediglich im Unilateral-Kollektiv vier homozygote Allelträgerinnen identifiziert werden konnten, während unter den bilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen und innerhalb des Kontrollkollektivs keine für das seltene Allel homozygoten Genotypen nachgewiesen wurden. Eine Assoziation zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko konnte für das *RAD51**135C-Allel nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 39 und Tabelle 40).

Parallel zu meiner Arbeit untersuchten Studien von Blasiak et al. (2003) und Kadouri et al. (2004) ebenfalls den Einfluss von *RAD51**135G>C als eigenständigen Faktor auf das Brustkrebsrisiko. Blasiak et al. (2003) verglichen in einem kleinen Kollektiv mit 46 Brustkrebspatientinnen und 60 gesunden Frauen die Verteilung der Genotypen des *RAD51**135G>C Polymorphismus. Die Häufigkeit des *RAD51**135C-Allels unterschied sich bei den Brustkrebspatientinnen nicht signifikant von der Kontrollgruppe (42 vs. 43). Kadouri et al. (2004) konnte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit des *RAD51**135C-Allels bei 155 Brustkrebspatientinnen und 142 gesunden Frauen nachweisen (10,3 % vs. 11,3 %). Das geschätzte relative Risiko für Brustkrebs lag bei 0,97 (95 % KI 0,47-2,00 ; p = 0,94) und war nicht signifikant erhöht.

Eine große australische Fall-Kontroll-Studie mit ca. 1500 Brustkrebspatientinnen und einer Kontrollgruppe mit ca. 800 gesunden Teilnehmerinnen von Webb et al. (2005) konnte die bisherigen Ergebnisse bestätigen. Die Verteilung des *RAD51**135C-Allels zeigte unter Brustkrebspatientinnen und Teilnehmerinnen der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied (p = 0,5). Aufgrund der niedrigen Genotypfrequenz von 0,3 % konnte ein erhöhtes Brustkrebsrisiko für homozygote Trägerinnen eines *RAD51**135C-Allels nicht ausgeschlossen werden. Man vermutete jedoch, falls tatsächlich eine Assoziation vorläge, dass der *RAD51**135C-Genotyp für weniger als 0,3 % aller Brustkrebsfälle eine kausale Rolle spiele.

Die vorliegende Arbeit unterstützt die Ergebnisse von Blasiak et al. (2003), Kadouri et al. (2004) und Webb et al. (2005). Demnach scheint die *RAD51*-Promotorvariante 135G>C unabhängig vom *BRCA1*- oder *BRCA2*-Status das relative Brustkrebsrisiko nicht signifikant zu erhöhen.

Ferner wurde von mir untersucht, ob durch die *RAD51*-Promotorvariante 135G>C ein Einfluss auf den Lymphknotenstatus der bilateral oder unilateral erkrankten

Brustkrebspatientinnen nachzuweisen war. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Polymorphismus *RAD51**135G>C sowohl beim Erst- als auch beim Zweitumor kein signifikanter Einfluss auf die Lymphknotenmetastasierung erzeugt wird (siehe Tabelle 42). Die Arbeit von Blasiak et al. (2003) ergab ebenfalls keine signifikante Häufung des *RAD51**135C-Allels bei Patientinnen mit positivem im Vergleich zu Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus (23 vs. 19; $p > 0,05$).

Im Rahmen meiner Arbeit wurde weiterhin geprüft, ob innerhalb der untersuchten Kollektive ein Einfluss des *RAD51**135C-Allels auf das histologische Grading invasiv duktaler Mammakarzinome nachweisbar sei. Diesbezüglich konnte kein signifikanter Trend in Richtung eines höheren bzw. niedrigeren Gradings bei *RAD51**135C- im Vergleich zu *RAD51**135G-Allelträgerinnen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 43). In der Arbeit von Blasiak et al. (2003) variierten die Frequenzen des *RAD51**135C-Allels verglichen mit denen des *RAD51**135G-Allels ebenfalls nicht signifikant bezüglich des histologischen Gradings in einem kleinen Kollektiv mit 34 duktalem Mammakarzinomen (GRAD I: 0 vs. 2, GRAD II: 17 vs. 13, GRAD III: 20 vs. 16; $p > 0,05$).

Ferner wurde von mir geprüft, ob ein Einfluss des *RAD51**135G>C-Polymorphismus auf das mittlere Alter bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms unabhängig vom Vorliegen einer *BRCA*-Mutation bestünde. Die Variante *RAD51**135G>C stellte in den von mir untersuchten Brustkrebskollektiven keinen signifikanten Einflussfaktor auf das mittlere Alter bei Erstdiagnose des Brusttumors dar (siehe Tabelle 46). Kadouri et al. (2004) beschäftigten sich ebenfalls mit dem Einfluss des Polymorphismus *RAD51**135G>C auf das mittlere Alter bei Erstdiagnose und nachgewiesener *BRCA2*-Mutation. Es konnte gezeigt werden, dass *BRCA2/RAD51**135C-Allelträgerinnen signifikant früher an Brustkrebs erkrankten verglichen mit *BRCA2/RAD51**135G-Allelträgerinnen [45 Jahre (95 % KI 36-54) vs. 52 Jahre (95 % KI 48-56); $p = 0,05$]. Levy-Lahad et al. untersuchten 2001 den Einfluss des *RAD51**135C-Allels auf das mittlere Alter bei Erstdiagnose eines Mammakarzinoms von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen. Hierbei konnte kein signifikanter Einfluss auf das Alter bei Erstdiagnose des Brustkrebs nachgewiesen werden. Der von Kadouri et al. (2004) erwiesene Effekt des *RAD51**135C-Allels scheint somit nur in Kombination mit einer *BRCA2*-Mutation vorzuliegen. In den von mir untersuchten Kollektiven lag keine solche doppelte Heterozygotie vor.

Darüber hinaus wurden von mir weitere klinischen Parametern wie das Tumorstadium, der Fernmetastasenstatus und die Familienanamnese bei bilateral und unilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen in Bezug auf eine Assoziation mit der *RAD51**135G>C-

Promotorvariante untersucht. Auch diesbezüglich konnte kein modulierender Einfluss der Variante nachgewiesen werden.

Zusammenfassend sollte festgehalten werden, dass im Rahmen dieser Arbeit und konform mit den in den letzten Jahren veröffentlichten Ergebnissen zu diesem Thema kein signifikanter Einfluss der *RAD51*-Promotorvariante 135G>C auf ein erhöhtes Brustkrebsrisiko unabhängig vom *BRCA1*- oder *BRCA2*-Status nachgewiesen werden konnte. Eine Gen-Gen-Interaktion mit der Folge eines erhöhten Erkrankungsrisikos in Subgruppen von Patientinnen mit bestimmten anderen Mutationen, wie z.B. in *BRCA2* oder anderen Genen der homologen Rekombinationsreparatur, ist damit jedoch nicht ausgeschlossen.

In meiner Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass der Basenaustausch 135G>C in der *RAD51*-Promotorregion zu einer ca. zwei- bis dreifach erhöhten Expression von RAD51 führt. Diese Überexpression wurde auf cDNA-Ebene nachgewiesen, aber auch auf Proteinebene beobachtet. In parallel durchgeführten Transfektionsanalysen konnten unsere Kooperationspartner aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Stürzbecher am Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Lübeck eine erhöhte *RAD51*-Genexpression für die Variante *RAD51**135G>C auch *in vitro* demonstrieren (Gerriets et al., 2003; Hasselbach et al., 2005). Eine Untersuchung der RAD51-Überexpression war auch Gegenstand verschiedener immunhistochemischer Arbeiten der letzten Jahre. Maacke et al. (2000) beschrieben eine Überexpression von Wildtyp RAD51-Protein in Brustkrebstumorzellen sowie eine signifikant positive Korrelation zwischen der RAD51-Überexpression und einem höheren histologischen Grading. Raderschall et al. (1999) berichteten bereits, dass RAD51 als Antwort auf DNA-Schäden nukleäre Foci um Einzelstrang-DNA bildet. In Übereinstimmung hiermit wiesen Maacke et al. (2000) die Überexpression von RAD51 in den Nuklei der Tumorzellen nach. Der Nachweis eines höheren histologischen Grading in Korrelation mit der Überexpression von Wildtyp RAD51 führte zu der Annahme, dass RAD51 an der Pathogenese des sporadischen Mammakarzinoms beteiligt ist. Die Überexpression von RAD51 wurde als Vorteil für die Tumorprogression gewertet, da RAD51 aufgrund seiner Reparaturfunktion die DNA-Schäden auf einem tolerablen Level hielt und so die Apoptose verhindert würde. Entsprechend nahm man an, dass *RAD51* auch als ein prädiktiver bzw. prognostischer Faktor für das invasiv duktales Mammakarzinom dienen könne. Eine Mutation innerhalb der kodierenden Sequenz des Gens, welche die Überexpression positiv beeinflusst, wurde von Maacke et al. (2000) nicht nachgewiesen. Erst ein Jahr später wurde der Polymorphismus *RAD51**135G>C von Wang et al. (2001) und Levy-Lahad et al. (2001) erstmals beschrieben. In einer Arbeit von Vispé et al., welche im Jahre 1998 erschien, wurden

bereits die Auswirkungen der Überexpression von RAD51 an Hamsterzellen untersucht. Die gesteigerte Expression des RAD51-Proteins wurde mit einer hohen DNA-Reparaturkapazität, erhöhten Rekombinationsraten und einer gesteigerten Widerstandsfähigkeit gegenüber ionisierender Strahlung assoziiert. Es wurde postuliert, dass bereits eine zwei- bis dreifache Überexpression des Proteins zu einer 20-fachen Steigerung homologer Rekombinationsvorgänge führe. Die gesteigerte Widerstandsfähigkeit gegenüber ionisierender Strahlung wurde vor allem in der S/G2-Phase des Zellzyklus nachgewiesen. West et al. zeigten 2003, dass die homologe Rekombinationsreparatur vor allem in der S- und G2-Phase vorherrscht, welche die Ergebnisse von Vispé et al. (1998) in einen Zusammenhang setzt. Im Gegensatz zu den von Vispé et al. (1998) veröffentlichten Ergebnissen lieferte eine Studie von Kim et al. (2001) allerdings das Ergebnis, dass die Überexpression von RAD51 die Rate an Doppelstrangbruch-induzierter homologer Rekombination reduziert. Die überexprimierten Proteine zeigten dabei vor allem einen negativen Effekt auf die Initialisierung der homologen Rekombination. Hierbei wurde unter anderem angenommen, dass die Überexpression von RAD51 zu einer ungleichen Stöchiometrie des Komplexes, welchen RAD51 mit den paralogen Proteinen und BRCA2 bildet, führe und somit dessen Funktion gestört würde. Raderschall et al. (2002a) und Richardson et al. (2004) vermuteten darüber hinaus, dass eine erhöhte Expression von RAD51 in Tumorzellen durch die Stimulation einer unkontrollierten Rekombination zu genetischer Instabilität und damit assoziierter Tumorprogression führe. Kim et al. (2001) und Richardson et al. (2004) nahmen bereits an, dass die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der RAD51-Überexpression möglicherweise aufgrund von unterschiedlichen Expressions-Levels entstünden. Raderschall et al. (2002b) zeigten eine sechs- bis elffach gesteigerte Expression von RAD51 in Tumorzellen wohingegen Vispé et al. (1998) nur von einer zwei- bis dreifachen Überexpression berichteten. In meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen der *RAD51**135G>C-Promotorvariante zu einer zwei- bis dreifachen Überexpression von RAD51 führt. Sofern dieses an Lymphozyten erhobene Ergebnis auf Brustdrüsenepithel übertragbar ist, könnte man im Hinblick auf die von Vispé et al. (1998) gelieferten Ergebnisse noch keinen negativen Effekt hinsichtlich DNA-Schäden vermuten. Bei BRCA2-Mangel würde sich das relative RAD51-Überangebot jedoch stark erhöhen und die von Raderschall und Richardson postulierte unkontrollierte Rekombination auslösen.

5.2 Diskussion der Varianten *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M

Kuschel et al. (2002) untersuchten in einer großen Fall-Kontroll-Studie mit bis zu 2205 Brustkrebspatientinnen und 1826 Kontrollen die Assoziation von 15 Polymorphismen in sieben DNA-Reparaturgenen, unter anderem die Mutationen *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M. Für die seltenen homozygoten *XRCC2**188H-Allelträgerinnen wurde ein erhöhtes Brustkrebsrisiko vermutet (OR: 2,6; 95 % KI 1,0-6,7; $p = 0,07$). Für die Mutation *XRCC3**T241M beschrieben Kuschel et al. (2002) einen signifikanten Unterschied in der Genotypverteilung bei Brustkrebspatientinnen und gesunden Kontrollpersonen ($p = 0,02$). Darüber hinaus konnte der homozygote *XRCC3**241M-Genotyp mit einem signifikant erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert werden (OR 1,3; 95 % KI 1,1-1,6; $p = <0,01$). Das Brustkrebsrisiko war bei den heterozygoten *XRCC3**241M-Allelträgerinnen ebenfalls grenzwertig erhöht (OR 1,1; 95 % KI 1,0-1,3; $p = 0,05$).

Auch Rafii et al. (2002) postulierten in einem Vergleich zwischen 521 Brustkrebspatientinnen und 895 Frauen eines Kontrollkollektivs die Assoziation des seltenen Allels *XRCC2**188H mit einem grenzwertig signifikant erhöhten Brustkrebsrisiko (OR: 1,3; 95 % KI 0,96-1,75).

In meiner hier vorliegenden Arbeit konnte entgegen diesen Berichten kein signifikanter Unterschied der identifizierten Allelfrequenzen für die *XRCC2**Mutation-R188H bei bilateral oder unilateral erkrankten Brustkrebspatientinnen im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung nachgewiesen werden (siehe Tabelle 38). Das Ergebnis war unabhängig von der Zahl der *XRCC2**188H-Allele. Eine Aussage über ein erhöhtes Brustkrebsrisiko für die seltenen homozygoten Trägerinnen des *XRCC2**188H-Allels konnte nicht getroffen werden, da lediglich eine Patientin mit Homozygotie für *XRCC2**188H im Unilateral-Kollektiv identifiziert wurde.

Für die *XRCC3*-Mutation T241M konnte ich ebenfalls keinen signifikanten Unterschied innerhalb der identifizierten Allelfrequenzen bei bilateral oder unilateral erkrankten Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu einer Stichprobe aus der Durchschnittsbevölkerung nachweisen (siehe Tabelle 38). Die *XRCC3*-Mutation T241M konnte unabhängig von der Zahl der vorliegenden 241M-Allele nicht mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert werden (siehe Tabelle 39 bis Tabelle 41).

Allerdings waren die im Rahmen meiner Arbeit untersuchten Kollektive deutlich kleiner als die untersuchten Fall-Kollektive von Kuschel et al. (2002) und Rafii et al. (2002). Es konnten jedoch auch viele spätere Arbeiten, die ehemals von Kuschel und Rafii beschriebenen Ergebnisse nicht bestätigen.

So wiesen Jacobsen et al. (2003) unter 426 Brustkrebspatientinnen und 424 weiblichen Kontrollen weder für heterozygote noch für homozygote Trägerinnen der *XRCC3*-Mutation T241M eine Assoziation mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko nach (OR 1,01; 95 % KI 0,75-1,35 und OR 0,89; 95 % KI 0,59-1,35). Figueiredo et al. (2004) beschrieben ebenfalls in einer Fall-Kontroll-Studie mit jeweils 402 Patientinnen und 402 Kontrollen allenfalls eine grenzwertig positive Assoziation des homozygoten *XRCC3**241M-Allels mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko (OR 1,44; 95 % KI: 0,94-2,19). Für den heterozygoten Genotyp konnte diese Assoziation jedoch nicht nachgewiesen werden.

Bezüglich der obenbeschriebenen Arbeiten hätte erwogen werden können, dass möglicherweise die Kollektivgröße in der Studie von Kuschel et al. (2002) einen das Signifikanzniveau modulierenden Faktor darstellt. Untersuchungen an größeren Kollektiven konnten jedoch ebenfalls nicht die Vermutung einer Assoziation von *XRCC2**R188H oder *XRCC3**T241M als Risikofaktor für eine Brustkrebsentstehung erhärten.

Han et al. (2004) untersuchten in einer „Nurse Health Study“ mit 1004 Brustkrebsfällen und 1385 gesunden Frauen als Kontrollen die Assoziation beider Mutationen, *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M, zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko. Weder die Mutation R188H (OR für 188H-Heterozygotie: 1,11; 95 % KI 0,86-1,43; OR für 188H-Homozygotie: 1,46; 95 % KI 0,46-4,42) noch die Mutation T241M (OR für 241M-Heterozygotie: 0,87; 95 % KI 0,72-1,05; OR für 241M-Homozygotie: 0,98; 95 % KI 0,75-1,28) waren signifikant mit der Entstehung von Brustkrebs assoziiert. Han et al. (2004) führt das von Kuschel et al. (2001) beobachtete signifikant erhöhte Brustkrebsrisiko für homozygote *XRCC2**188H-Allelträgerinnen auf den unterrepräsentierten H/H-Genotyp innerhalb des Kontrollkollektivs zurück. Demnach wurden sechs Frauen mit H/H-Genotyp identifiziert. Nach der Hardy-Weinberg-Regel wären jedoch zehn bis elf homozygote Allelträgerinnen erwartet worden.

Auch die von Webb et al. (2005) veröffentlichte Fall-Kontroll-Studie mit ca. 1500 Brustkrebspatientinnen und einer aus ca. 800 Frauen bestehenden Kontrollgruppe zeigte in der Verteilung der Varianten *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M bei Brustkrebspatientinnen und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,8$ und $p = 0,6$). Ferner konnte für jedes veränderte Allel im Vergleich zum Wildtyp bei beiden Varianten kein signifikant erhöhtes Brustkrebsrisiko nachgewiesen werden (*XRCC2*: GA/AA vs. GG: OR 0,98; 95 % KI 0,76-1,26 und *XRCC3*: CT/TT vs. CC: OR 0,92; 95 % KI 0,77-1,10). Aufgrund der niedrigen Genotypfrequenz wurde von den Autoren für homozygote Trägerinnen der Variante *XRCC2**188H ein erhöhtes Brustkrebsrisiko nicht vollständig ausgeschlossen. Es wurde allerdings angenommen, dass die seltene Variante *XRCC2**188H in weniger als 0,4 % aller

Brustkrebsfälle eine kausale Rolle spielen. Für die homozygoten Trägerinnen der Variante *XRCC3*241M* wurde ein allenfalls grenzwertig erhöhtes Brustkrebsrisiko erwogen, welches aufgrund der Allelfrequenz in ca. 1,9 % aller Brustkrebsfälle eine Rolle spielen würde.

In einer kürzlich veröffentlichten Meta-Analyse aller publizierten Ergebnisse aus eurokaukasischen Bevölkerungsgruppen mit über 10.000 Fällen und Kontrollen, welche auf die Mutation *XRCC3*T241M*, und über 8.000 Fällen und Kontrolle, welche auf die Mutation *XRCC2*R188H* getestet wurden, zeigt sich lediglich ein schwach erhöhtes Risiko für eine Brustkrebsentstehung bei homozygoten Trägerinnen der Variante T241M (OR 1,16; 95 % KI 1,04-1,30). Für homozygote Trägerinnen der Variante R188H wurde ein kausaler Zusammenhang bezüglich einer Brustkrebsentstehung ausgeschlossen (OR 1,06; 95 % KI 0,59-1,91) (Garcia-Closas et al., 2006).

Die Ergebnisse der vergangenen Jahre reflektieren, dass die in den Erstberichten nachgewiesenen Assoziationen der Varianten *XRCC2*R188H* und *XRCC3*T241M* mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in den darauffolgenden Arbeiten nicht bestätigt werden konnten. Diese Situation spiegelt die falsch positive Natur der Erstberichte wieder, welche vermutlich auf das Auftreten von systematischen Fehlern durch Anwendung der üblichen Signifikanzlevel zurückzuführen ist. Diese Falsch-Positiv-Rate der Ergebnisse kann durch die Anwendung von härteren Signifikanzkriterien gemindert werden (Tabor et al., 2002). Dennoch muss man davon ausgehen, dass die Mehrzahl der Erstberichte von Assoziationsstudien in Replikationsstudien nicht bestätigt werden können (Ioannidis et al., 2006).

Daraus könnte gefolgert werden, dass es größerer Studienkollektive und härterer Signifikanzkriterien bedarf, um ein erhöhtes Erkrankungsrisiko der beschriebenen Varianten aufzudecken und zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurde das „Breast Cancer Association Consortium“ (BCAC) gegründet, welches sich aus 18 verschiedenen internationalen Arbeitsgruppen zusammensetzt. Auch die in meiner Doktorarbeit beschriebenen Ergebnisse zu den Untersuchungen der Genvarianten *XRCC2*R188H* und *XRCC3*T241M* waren integrierter Bestandteil der Arbeit des BCAC (Breast Cancer Association Consortiums, 2006). Ziel dieser Zusammenarbeit war die kombinierte Analyse von 16 Genvarianten, welche jeweils zuvor in mindestens drei Einzelstudien auf eine Assoziation mit der Brustkrebsentstehung untersucht worden waren. Die Spannweite der Kollektive von Brustkrebspatientinnen und gesunden Frauen einer Kontrollstichprobe reichte im Rahmen dieser gemeinschaftlichen Arbeit von 12.000 bis 32.000. Hier soll im Folgenden nur auf die Ergebnisse der gemeinsamen Analyse des BCAC bezüglich der Varianten *XRCC2*R188H*

und *XRCC3**T241M eingegangen werden. Insgesamt zehn Studien beschäftigten sich mit der *XRCC2*-Variante R188H, über 14.000 Brustkrebspatientinnen und über 13.000 Kontrollprobandinnen wurden auf die Mutation hin untersucht. Ein erhöhtes Brustkrebsrisiko konnte weder für heterozygote noch für homozygote Trägerinnen der Mutation *XRCC2**R188H bestätigt werden (OR 0,95; 95 % KI 0,89-1,02 und OR 0,92; 95 % KI 0,69-1,22). Des Weiteren konnte für heterozygote und homozygote Trägerinnen der Mutation *XRCC3**T241M keine klare Assoziation mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko nachgewiesen werden (OR 1,03; 95 % KI 0,98-1,09 und OR 1,08; 95 % KI 0,99-1,16). Angesichts der engen Konfidenzintervalle in dieser umfangreichen Konsortiumsarbeit kann ein „gene-only“-Effekt für die Varianten *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M wohl weitgehend ausgeschlossen werden. Es bliebe dennoch die Möglichkeit, dass diese Varianten unter bestimmten Umweltbedingungen oder in Gen-Gen-Interaktionen eine disponierende oder modulierende Rolle spielen.

Ziel meiner Arbeit war es ebenfalls die Mutationen *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M auf mögliche Assoziationen zu klinischen Parametern der Brustkrebserkrankung hin zu untersuchen. Auch einige der oben erwähnten Arbeiten untersuchten Zusammenhänge dieser Mutationen auf bestimmte klinische Parameter, wie im Folgenden weiter erläutert werden soll.

Die Mutationen *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M wurde von Kuschel et al. (2001) innerhalb des Brustkrebspatientinnen-Kollektivs auch in Abhängigkeit vom Lebensalter untersucht. Die Verteilung der Genotypen des *XRCC3**241M-Allels wies einen signifikanten Unterschied bei Frauen unter 50 Jahren verglichen mit Frauen über 50 Jahren auf ($p = <0,01$), welches zur Vermutung Anlass gab, dass das spezifische genetische Risiko vom Lebensalter abhängig sei. Für das *XRCC2**188H-Allel konnte ein solcher Unterschied nicht festgestellt werden ($p = 0,57$).

In meiner Arbeit sollte daher geprüft werden, ob für *XRCC3**241M- sowie *XRCC2**188H-Allelträgerinnen und Trägerinnen der jeweiligen Wildtypallele ein Altersunterschied bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms bestand. Für Trägerinnen der Variante *XRCC3**T241M konnte ich allenfalls ein Trend im Hinblick auf ein früheres Erkrankungsalter verglichen mit Trägerinnen beider Wildtypallele zeigen (siehe Tabelle 46). Für Trägerinnen des *XRCC2**188H-Allels konnte ein solcher Altersunterschied verglichen mit Trägerinnen beider Wildtypallele nicht nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für den Ersttumor als auch den Zweitumor bilateral betroffener Patientinnen ebenso wie für unilateral betroffene Brustkrebspatientinnen (siehe Tabelle 46).

Webb et al. (2006) konnten bezüglich der Allelverteilung der Mutationen *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M in verschiedenen Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Die Analyse des BCAC ergab ebenfalls keine signifikante Veränderung des Brustkrebsrisikos bei *XRCC3**T241M- bzw. *XRCC2**R188H-Mutationsträgerinnen für unterschiedliche Altersgruppen (The Breast Cancer Association Consortium, 2006).

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob bei *XRCC2**188H- oder *XRCC3**241M-Allelträgerinnen signifikant häufiger eine positive Familienanamnese vorlag als im Vergleich zu Trägerinnen beider Wildtypallele. Ein signifikanter Einfluss auf die Familienanamnese konnte bei beiden Mutationen nicht nachgewiesen werden. Im Unilateral-Kollektiv bestand allerdings für die Mutation *XRCC3**T241M ein Trend hin zu einer positiven Familienanamnese für die hetero- und homozygoten Trägerinnen des Methionin-Allels; bei den bilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen war dieser Trend jedoch nicht zu verzeichnen (siehe Tabelle 47). Die Kollektive von Figueiredo et al. (2004) und Han et al. (2004) wurde ebenfalls auf diesen Zusammenhang hin untersucht. Figueiredo et al. (2004) konnten für das *XRCC3**241M-Allel keinen signifikanten Zusammenhang mit einer positiven Familienanamnese für Brustkrebs nachweisen ($p = 0,82$). Han et al. (2004) beobachteten kein erhöhtes Brustkrebsrisiko für Träger des *XRCC2**188H-Allels oder des *XRCC3**241M-Allels in Kombination mit einer positiven Familienanamnese (OR 2,42; 95 % KI 1,43-4,09 und OR 1,47; 95 % KI 1,08-2,02). Die Analyse des BCAC bestätigte diesen Zusammenhang (The Breast Cancer Association Consortium, 2006).

Bei der Frage nach einer Assoziation der Mutationen *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen fand ich im Rahmen meiner Arbeit für beide Mutationen beim bilateralen Mammakarzinom entgegen den Erwartungen sogar Hinweise auf einen möglichen protektiven Effekt (siehe Tabelle 42). Da sich im Unilateral-Kollektiv ein solcher Effekt nicht bestätigen ließ, müsste weitergehend dahin untersucht werden, ob die Mutationen *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M eventuell nur bei Auftreten eines bilateralen Mammakarzinoms eine lymphogene Metastasierung verhindern würden; eine solche Differenzierung ist allerdings schwer zu begründen.

Ebenso wurde in meiner Arbeit ein inkonstanter, protektiver Einfluss der *XRCC3**T241M-Mutation auf das Tumorstadium nachgewiesen. Bilateral erkrankte Patientinnen hatten bei Erstdiagnose des Zweitumors und gleichzeitigem Vorliegen der Mutation *XRCC3**T241M ein nahezu signifikant niedrigeres Tumorstadium als Trägerinnen beider Wildtypallele. Für den Ersttumor und bei unilateral betroffenen Patientinnen war ein solcher Effekt jedoch nicht nachweisbar (siehe Tabelle 44).

Einen deutlichen Trend lieferte die Frage nach einem Einfluss der *XRCC2*-Mutation R188H auf die Häufigkeit einer Fernmetastasierung des unilateralen Mammakarzinoms. Mutationsträgerinnen waren häufiger von Fernmetastasen betroffen als Nicht-Mutationsträgerinnen. Bei bilateral auftretenden Tumoren war dieser Effekt allerdings nicht zu verzeichnen (siehe Tabelle 45).

Folgeuntersuchungen müssten nun zeigen, ob diese eher günstigeren Effekte der Varianten *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M auf das bilaterale Mammakarzinom und der eher aggressivere Effekt auf das unilaterale Mammakarzinom replizierbar sind. Die Interpretation wird erschwert durch die Tatsache, dass die Trends oft nur in einem der beiden Untersuchungskollektive aufgefallen sind. Erwähnt werden sollte ferner, dass die klinischen Daten vor allem für das Unilateral- Kollektiv zum Teil nur unvollständig zusammengetragen werden konnten, was das Risiko für systematischen Fehler erhöht. Eine prospektive Studie wäre notwendig, um diese Risiken zu verringern und die Ergebnisse zu replizieren.

Abschließend kann festgehalten werden, dass nach neuesten Erkenntnissen und entgegen den Erstberichten die beiden untersuchten Mutationen *XRCC2**R188H und *XRCC3**T241M keine zentrale Rolle in der Brustkrebsentstehung einzunehmen scheinen. Die hier vorliegende Arbeit konnte im Rahmen einer gemeinschaftlichen internationalen Studie einen Beitrag zu diesem Ergebnis leisten.

5.3 Diskussion der *XRCC4* Mutationen I134T und IVS7-1G>A

Die *XRCC4*-Mutationen I134T und IVS7-1G>A wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit neu identifiziert. Zum Zeitpunkt der Identifizierung und des Screenings dieser Mutationen in den Brustkrebskollektiven lag keine mir bekannte Literatur vor, die diese Mutationen beschrieb. Die Missense-Mutation I134T im Exon 4 des *XRCC4*-Gens entsteht durch Transition von Thymin zu Cytosin am 401. Nukleotid der kodierenden Sequenz. Dadurch wird anstelle von Isoleucin Threonin in die Polypeptidkette des wachsenden *XRCC4*-Proteins eingebaut. Die Transition von Guanin zu Adenin am letzten Nukleotid des Intron 7 des *XRCC4*-Gens hat nach meinen Untersuchungen ein alternatives Spleißen zur Folge. Dieses alternative Spleißen führt exklusiv zur Nutzung einer anderen Spleißstelle bei Vorliegen der Mutation. Hierbei wird entgegen der herkömmlichen Spleißstelle, die durch die Mutation IVS7-1G>A nicht mehr als solche erkannt wird, ein Guanin genau sechs Basen weiter in der kodierenden Sequenz des Exon 8 als Akzeptorspleißstelle erkannt. Als Konsequenz des alternativen Spleißens kommt es zum Verlust der Aminosäuren Arginin und Serin auf Position 298 und 299; des Weiteren wird Asparagin an Position 300 durch Lysin substituiert.

Das *XRCC4*-Gen nimmt eine wichtige Rolle im NHEJ-Reparaturweg bei DNA-Doppelstrangbrüchen ein. Mit dem Screening der Brustkrebskollektive und der Stichprobe aus der Durchschnittsbevölkerung auf die Mutationen I134T und IVS7-1G>A hin sollte untersucht werden, ob diese *XRCC4*-Mutationen möglicherweise die Brustkrebsentstehung beeinflussen.

Es wurde gezeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den identifizierten Allelfrequenzen der *XRCC4*-Mutationen I134T und IVS7-1G>A im Bilateral- und Unilateral-Kollektiv sowie der Stichprobe aus der Durchschnittsbevölkerung vorlag (siehe Tabelle 38). Es konnte allenfalls ein Trend bezüglich eines erhöhten unilateralen Brustkrebsrisikos bei Trägerinnen der Mutation *XRCC4**IVS7-1G>A von mir nachgewiesen werden (siehe Tabelle 39). Auffällig war jedoch, dass die einzigen identifizierten homozygoten Allelträgerinnen der Spleißmutation IVS7-1G>A drei bilateral und zwei unilateral erkrankte Brustkrebspatientinnen waren. In der Kontrollgruppe aus der Durchschnittsbevölkerung konnte kein homozygoter Allelträger für die Spleißmutation identifiziert werden. Dieser Befund ist derzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, welche auf drei große Kollektive mit über 2500 Patientinnen ausgeweitet worden sind.

Bei Trägerinnen der Variante *XRCC4**I134T konnte kein erhöhtes Brustkrebsrisiko nachgewiesen werden (Tabelle 39 und Tabelle 40). Für die seltene Homozygotie

*XRCC4**134T konnte die Fragestellung nach einem erhöhten Brustkrebsrisiko nicht beantwortet werden, da nur eine homozygote *XRCC4**134T-Allelträgerin im Unilateral-Kollektiv identifiziert werden konnte. Gegebenenfalls könnte diese Fragestellung innerhalb der Arbeitsgruppe in einem größeren Kollektiv erneut überprüft werden.

Außerdem wurde im Rahmen meiner Arbeit untersucht, ob für die beiden neu identifizierten *XRCC4*-Mutationen Assoziationen zu bestimmten klinischen Charakteristika der Brustkrebserkrankung nachweisbar waren.

Es konnte weder für die Mutation *XRCC4**I134T noch für die Mutation *XRCC4**IVS7-1G>A eine Assoziation mit einer lymphatischen Metastasierung bei bilateralem oder unilateralem Mammakarzinom nachgewiesen werden (siehe Tabelle 42).

Ein Einfluss der Mutationen *XRCC4**I134T und *XRCC4**IVS7-1G>A auf das Tumorstadium konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 44). Ferner ergab sich kein Einfluss dieser Genvarianten auf das Grading invasiv duktaler Tumoren (siehe Tabelle 43).

Sehr auffällig war jedoch die Assoziation der *XRCC4*-Spleißmutation mit dem Vorliegen einer Fernmetastasierung. Unter den unilateralen Mammakarzinompatientinnen trat bei mindestens einem veränderten Allel für die Mutation auffallend häufiger eine Fernmetastasierung auf als bei Patientinnen mit beiden Wildtypallelen (siehe Tabelle 45). Auch bei den bilateralen Brustkrebspatientinnen mit mindestens einem *XRCC4**IVS7-1A-Allel lag ein solcher Trend in Richtung Fernmetastasierung vor. In einer „follow-up“-Studie sollen nun die medianen Überlebenszeiten von Trägerinnen und Nichtträgerinnen der Spleißmutation verglichen werden.

Ebenfalls zeigte sich ein deutlicher Altersunterschied zwischen bilateral erkrankten Brustkrebspatientinnen mit mindestens einem *XRCC4**IVS7-1A-Allel und solchen mit zwei Wildtypallelen. Erstgenannte waren deutlich früher am Ersttumor erkrankt, beim Auftreten des Zweittumors war dieser Altersunterschied ebenfalls sichtbar. Bei unilateral erkrankten Brustkrebspatientinnen war dieser Altersunterschied weniger stark ausgeprägt. Beim Vergleich aller Trägerinnen der Variante im Vergleich zu Nicht-Trägerinnen konnte dieser Altersunterschied noch deutlicher gezeigt werden (siehe Tabelle 46).

Ferner wurde bei hetero- oder homozygoten Allelträgerinnen der Spleißmutation IVS7-1G>A bei unilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen ein Trend im Hinblick auf eine positive Familienanamnese nachgewiesen (siehe Tabelle 47). Bei bilateral betroffenen Patientinnen war dieser Trend allerdings nicht erkennbar.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Allen-Brady et al. (2006) wurde die Rolle von vier anderen Einzelnukleotidpolymorphismen (X1-X4) im *XRCC4*-Gen in Hinblick auf ein

erhöhtes Brustkrebsrisiko sowie im Hinblick auf das Alter bei Erstdiagnose untersucht. Die Untersuchungen wurden an ca. 460 Brustkrebspatientinnen, welche weder auf eine *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation positiv getestet worden waren, und ca. 570 gesunden Kontrollprobandinnen durchgeführt. Die vier Einzelnukleotidpolymorphismen im *XRCC4*-Gen waren bereits in einer im Jahre 2005 veröffentlichten Arbeit von Allen Brady et al. identifiziert worden. Die dort beschriebenen Polymorphismen befinden sich in Intron-Abschnitten des *XRCC4*-Gens. Im wesentlichen wurden in dieser Arbeit kombinierte Analysen der vier ermittelten Polymorphismen des *XRCC4*-Gens in Form von Haplotyp-Analysen getätigt. Es wurde eine signifikante Assoziation zum Alter bei Erstdiagnose nachgewiesen; der vier-*locus*-Haplotyp A-G-T-G wurde mit einem späteren Alter bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms assoziiert (67 vs. 55 Jahre; $p=0,001$). Der vier-*locus*-Haplotyp G-A-T-T zeigte hingegen einen Trend hin zu einem jüngeren Alter bei Erstdiagnose (54 vs. 56 Jahre; $p=0,0085$). Zwei zwei-*locus*-Haplotypen für die Einzelnukleotidpolymorphismen X1 und X2 lieferten auffällige Ergebnisse im Hinblick auf das Brustkrebsrisiko. Der Haplotyp G-G wurde mit einem erniedrigten Brustkrebsrisiko assoziiert (OR 0,57; 95 % KI 0,36-0,90; $p=0,014$), während der Haplotyp G-A mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht wurde (OR 1,30; 95 % KI 1,02-1,67; $p=0,033$).

Ebenso wurde bereits in einer 2003 von Fu et al. veröffentlichten Arbeit ein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung eines weiteren intronständigen Polymorphismus des *XRCC4*-Gens bei Brustkrebspatientinnen entdeckt ($p=0,02$). Dieser Polymorphismus wurde mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht.

Allen Brady et al. (2006) vermuteten, konform mit den von Fu et al. (2003) gelieferten Ergebnissen, dass *XRCC4* eine Rolle in der Brustkrebsentstehung einzunehmen scheint. Darüber hinaus ziehen Allen Brady et al. in Erwägung, dass das Erkrankungsalter durch *XRCC4* modifiziert werden könnte.

García-Closas et al. (2006) berichteten kürzlich in einer amerikanischen Fall-Kontroll-Studie erstmals, soweit mir bekannt, über die in der vorliegenden Arbeit untersuchte *XRCC4*-Spleißmutation. Interessanterweise wird hier der Basenaustausch als IVS7-1A>G beschrieben. Entgegengesetzt meiner Arbeit bezeichneten García-Closas den Genotyp AA als Wildtyp. Möglicherweise liegen diesbezüglich populationsbedingte Unterschiede in der Genotypverteilung vor. Diese Annahme wird ebenfalls gestützt durch neue Einträge in die SNP-Datenbank. Die Substitution IVS7-1A>G ist hier seit einiger Zeit unter dem „SNP-ID“ rs 1805377 gelistet. Gemäß der SNP-Datenbank herrscht der Genotyp GG in der kaukasischen Bevölkerung vor, wohingegen in asiatischen und afrikanischen Bevölkerungsgruppen der

Genotyp AA dominiert. Dies entspricht auch Befunden unserer Arbeitsgruppe an verschiedenen Bevölkerungen im eurasischen Raum. Kontrovers zu den Einträgen in der SNP-Datenbank beschrieben García-Closas et al. (2006) den Genotyp AA als Wildtyp in der kaukasisch-stämmigen amerikanischen Bevölkerung. Für die in ihrer Arbeit beschriebene Mutation IVS7-1A>G konnte zwar keine signifikante Assoziation zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko nachgewiesen werden. In einer aktuellen Folgearbeit beschreibt die gleiche Arbeitsgruppe allerdings eine signifikante Assoziation des IVS7-1A>G Allels mit dem Auftreten von Blasenkarzinomen (Figueroa et al., 2007).

In meiner hier vorliegenden Arbeit konnte hinsichtlich der Spleißmutation IVS7-1G>A kein direkter Zusammenhang mit einer Brustkrebsentstehung belegt werden. Seltene homozygote Trägerinnen dieser Variante wurden jedoch nur bei Brustkrebspatientinnen identifiziert, welches auch im Hinblick auf die von Allen Brady et al. (2006) und Fu et al. (2003) geäußerten Vermutungen, *XRCC4*-Mutationen würden die Brustkrebsentstehung beeinflussen, zu weiteren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe Anlass gab. Diese Vermutung stützend konnte ich für *XRCC4**IVS7-1A-Allelträgerinnen ein Trend bezüglich eines jüngeren Alters bei Diagnose des Erst- und Zweitumors bilateraler Mammakarzinome belegen. Ferner konnte ein begünstigender Einfluss der Spleißmutation IVS7-1G>A auf eine Fernmetastasierung nachgewiesen werden. Die vorliegende Arbeit ergänzt somit die bereits publizierten Ergebnisse dahingehend, dass der *XRCC4*-Spleißmutation IVS7-1G>A mutmaßlich eine Rolle in der Brustkrebsentstehung und dem Krankheitsverlauf eingeräumt wird.

Eine Studie von Matsumoto et al. (2000), welche sich mit der Phosphorylierung des *XRCC4*-Proteins befasst, war Ausgangspunkt der im Rahmen meiner Arbeit zu diesem Thema durchgeführten Untersuchungen. Von Matsumoto et al. (2000) wurde ein als p60 bezeichnetes Protein als die durch DNA-PKcs phosphorylierte Form von *XRCC4* identifiziert, da sie in DNA-PKcs defizienten Zelllinien nicht nachweisbar und darüber hinaus auf Phosphatase sensibel war. In AT (Ataxia teleangiectatica)-Zelllinien konnte p60 nach Einwirkung von ionisierender Strahlung detektiert werden. Die Autoren vermuteten somit, dass die Phosphorylierung von *XRCC4* nicht durch ATM katalysiert wird. In Übereinstimmung mit Matsumoto et al. (2000) konnte die strahleninduzierte Phosphorylierung von *XRCC4* auch in den von mir durchgeführten Untersuchungen über einen Mobilitätsunterschied elektrophoretisch nachgewiesen werden. Es wurden auch Zelllinien von Patienten mit Homozygotie für die Spleißmutation IVS7-1G>A auf die strahleninduzierte Phosphorylierung hin untersucht. Hier war die Phosphorylierung ebenso wie bei der Wildtyp-Kontrollprobe als p60-Bande nachweisbar. Die Spleißmutation IVS7-1G>A scheint somit keinen Einfluss auf

die strahleninduzierte Phosphorylierung zu haben. Lee et al. (2004) und Yu et al. (2003) belegten bereits, dass die DNA-PKcs abhängige XRCC4-Phosphorylierung vor allem an den Serin-Aminosäureresten 260 und 318 erfolgt. Durch die Mutation *XRCC4*IVS7-1G>A* kommt es zum Verlust der Aminosäuren Arginin und Serin auf Position 298 und 299 sowie zur Substitution von Asparagin an Position 300 durch Lysin. Die Aminosäuren 260 und 318 werden durch die Mutation nicht verändert, so dass dies eine mögliche Erklärung sein kann. Als Vergleichszelllinie mit Homozygotie für *XRCC4*IVS7-1G* wurde unter anderem auch eine Zelllinie mit ATM-Mutation eingesetzt. Auch bei dieser AT-Zelllinie wurde die Phosphorylierung des XRCC4-Proteins als p60 Bande nachgewiesen, so dass auch hier in Anlehnung an die Ergebnisse von Matsumoto et al. (2000) ein Hinweis dafür vorliegen könnte, dass XRCC4 ATM-unabhängig phosphoryliert werden kann. Allerdings wurde die phosphorylierte Form in der AT-Linie im Vergleich zu den anderen Zelllinien schwächer detektiert (siehe Abbildung 23). Die Frage, inwieweit ATM an der XRCC4-Phosphorylierung beteiligt ist, wird von unserer Arbeitsgruppe derzeit weiter verfolgt.

Lee et al. (2004) berichteten, dass ein Aminosäureaustausch an den Positionen 260 und 318 von Serin nach Alanin keine Auswirkung auf die „end-joining“-Aktivität von XRCC4 hat. Der durch DNA-PKcs vermittelten Phosphorylierung von XRCC4 wurde somit insgesamt eher eine indirekte Kontrollfunktion des NHEJ zugeschrieben. In einer kürzlich erschienen Arbeit von Yurchenko et al. (2006) wird über eine Modifikation von XRCC4 im Anschluss an seine Translation durch ein als SUMO bezeichnetes Peptid berichtet. Das Anhängen dieses Peptides an Lysin 210 von XRCC4 wird auch als SUMO-ylisierung bezeichnet. Das SUMO-ylierte Protein weist gemäß Yurchenko eine Größe von ca. 95 kDa auf, zusätzlich wurde des Weiteren ein koprezipitierendes Protein bei 90 kDa nachgewiesen. Yurchenko et al. (2006) wiesen bei Zellen mit mangelnder SUMO-ylisierung des XRCC4-Proteins eine erhöhte Strahlensensibilität nach. Mit der erhöhten Strahlensensibilität wurde gleichzeitig eine fehlende Mobilisierung des XRCC4-Proteins in den Zellkern bei der DNA-Doppelstrangbruchreparatur detektiert.

Auch in den von mir durchgeführten Western Blots wurden Banden im Bereich 90-95 kDa detektiert. Zusätzlich wurden bislang unbekannte Banden im Bereich von ca. 75 kDa detektiert (siehe Abbildung 23). Die Frage nach einem Zusammenhang dieser immunreaktiven Nebenbanden mit einer SUMO-ylisierung wird aktuell von unserer Arbeitsgruppe weiterverfolgt.

Da durch die Spleißmutation *IVS7-1G>A* ein neuer Lysin-Rest an Position 300 des XRCC4-Proteins entsteht, und damit ein sogenanntes KEN-Motiv, könnte im Weiteren untersucht

werden, ob hierdurch auch eine Modifikation durch Ubiquitinierung und/oder SUMOylierung erzeugt wird. Die in meiner Arbeit erzielten Ergebnisse bieten also Anlass für weitere Assoziationsstudien und funktionelle Untersuchungen zur Klärung der Rolle des XRCC4-Proteins beim Mammakarzinom.

6 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom gehört zu den häufigsten malignen Erkrankungen der Frau. Eine multifaktorielle Genese ist aufgrund der unterschiedlichen Risikofaktoren, welche für eine Brustkrebserkrankung disponieren, wahrscheinlich. Man vermutet, dass die meisten Brustkrebsfälle eine genetisch disponierte Komponente aufweisen. In ca. 2-8 % aller Brustkrebsfälle liegt eine bilaterale Erkrankung vor. Dieser wird eine Indikatorfunktion für das Vorliegen einer genetischen Prädisposition eingeräumt. Neben den bislang bekannten Mutationen der Gene *BRCA1* und *BRCA2*, welche mit einem Großteil der familiären Mammakarzinomfälle assoziiert sind, wird derzeit nach weiteren Varianten in DNA-Reparaturgenen gesucht, welche ebenfalls eine Rolle in der Brustkrebsentstehung einnehmen könnten.

In meiner Doktorarbeit wurde die Prävalenz häufiger bereits bekannter Polymorphismen der DNA-Reparaturgene *RAD51*, *XRCC2* und *XRCC3* bei Patientinnen mit bilateralem sowie unilateralem Mammakarzinom und der Durchschnittsbevölkerung verglichen. Die gewählten Gene spielen wie *BRCA2* eine zentrale Rolle in der homologen Rekombinationsreparatur. Für die Assoziationsstudie wurden zwei paarweise abgeglichene Kollektive von 120 bilateral und 120 unilateral betroffenen Patientinnen erstellt. 120 freiwillige Blutspender aus der Durchschnittsbevölkerung dienten als Vergleichskollektiv.

Die von mir mittels restriktionsenzymatischer Spaltung untersuchten Allelfrequenzen der Varianten *RAD51*135G>C*, *XRCC2*R188H* und *XRCC3*T241M* unterschieden sich bei bilateral oder unilateral betroffenen Brustkrebspatientinnen nicht signifikant von denen des Vergleichskollektivs. Ferner konnte in meinen Untersuchungskollektiven kein signifikanter Einfluss dieser Genvarianten auf den klinischen Verlauf der Erkrankung nachgewiesen werden. Meine Ergebnisse für die Varianten *XRCC2*R188H* und *XRCC3*T241M* lieferten diesbezüglich einen Beitrag zu einer gemeinschaftlichen internationalen Studie des Breast Cancer Association Consortium.

Eine initiale Vermutung, die Promotorvariante *RAD51*135G>C* könnte überproportional häufiger bei männlichen Brustkrebspatienten vertreten sein, wurde in einer Folgestudie nicht erhärtet. In weiterführenden Untersuchungen konnte ich allerdings auf cDNA-Ebene nachweisen und auf Proteinebene bestätigen, dass der Polymorphismus *RAD51*135G>C* zu einer zwei- bis dreifach erhöhten Expression von RAD51 führt und damit funktionelle Relevanz haben dürfte.

Im zweiten Teil meiner Arbeit befasste ich mich mit dem *XRCC4*-Gen, einem zentralen Mediator des „non-homologous end-joining“-Reparaturweges. Durch Direktsequenzierungen wurden zwei neue Genvarianten von mir identifiziert und im Anschluss geeignete Testverfahren etabliert. In weiteren Untersuchungen auf cDNA-Ebene konnte für die Mutation *XRCC4*IVS7-1G>A* ein alternatives Spleißen nachgewiesen werden, welches den Verlust von zwei Aminosäuren sowie eine Aminosäuresubstitution zur Folge hat. Meine Untersuchungen auf Proteinebene ergaben, dass die Spleißmutation *IVS7-1G>A* das Expressionsniveau sowie die strahleninduzierte Phosphorylierung von *XRCC4* nicht messbar beeinflusst. Die Allelfrequenzen der Mutationen *XRCC4*I134T* und *XRCC4*IVS7-1G>A* unterschieden sich nach meinen Untersuchungen nicht signifikant zwischen Brustkrebspatientinnen und der Durchschnittsbevölkerung. Homozygote Allelträgerinnen für *XRCC4*IVS7-1A* wurden jedoch nur bei Brustkrebspatientinnen identifiziert. Für Trägerinnen dieser Mutation scheint nach meinen Untersuchungen ferner ein Zusammenhang mit einem früheren Erkrankungsalter und mit einer häufigeren Fernmetastasierung zu bestehen, so dass für die Spleißmutation *XRCC4*IVS7-1G>A* eine Rolle in der Brustkrebsentstehung vermutet werden kann und diese möglicherweise auch den Verlauf der Erkrankung beeinflussen kann. Meine erhobenen Befunde bezüglich der Variante *XRCC4*IVS7-1G>A* werden nun in größeren Fallstudien innerhalb unserer Arbeitsgruppe geprüft.

7 Literaturverzeichnis

Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA non-homologous end-joining. *Cell* 2006; 124: 301-313

Albala JS, Thelan MP, Prange C, Fan W, Christensen M, Thompson LH, Lennon GG. Identification of a novel human RAD51 homolog, RAD51B. *Genomics* 1997; 46: 476-479

Allen-Brady K, Camp NJ. Characterization of the linkage disequilibrium structure and identification of tagging-SNPs in five DNA repair genes. *BMC Cancer* 2005; 5: 99

Allen-Brady K, Cannon-Albright LA, Neuhausen SL, Camp NJ. A role for XRCC4 in age at diagnosis and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2006; 15: 1306-1310

Anderson DE. Some characteristics of familiar breast cancer. *Cancer* 1971; 28: 1500-1505

Athma P, Rappaport R, Swift M. Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genetics Cytogenetics* 1996; 92: 130-134

Backe J, Hofferbert S, Skawran B, Dörk T, Stuhmann M, Karstens JH, Untch M, Meindl A, Burgemeister R, Chang-Claude J, Weber BHF. Frequency of BRCA1 mutation 5382insC in German breast cancer patients. *Gynecological Oncology* 1999; 72: 402-406

Barnett JB. The relationship between obesity and breast cancer risk and mortality. *Nutrition Reviews* 2003; 61: 73-76

Baselga J. Clinical trials of Herceptin[®] (trastuzumab). *European Journal of Cancer* 2001; 37: 18-24

Beckmann MW, Fasching PA, Gall C, Bani M, Brumm C, Krämer S. Genetische Risikofaktoren des Mammakarzinoms. *Der Gynäkologe* 2002; 35: 527-536

Bergthorsson JT, Ejlersen B, Olsen JH, Borg A, Nielsen KV, Barkardottir RB, Klausen S, Mourdisen HT, Winther K, Fenger K, Niebuhr A, Harboe TL, Niebuhr E. BRCA1 and BRCA2 mutation status and cancer family history of Danish women affected with multifocal or bilateral breast cancer at a young age. *Journal of Medical Genetics*. 2001; 38: 361-368

Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut. *Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends*. 5. überarbeitete und aktualisierte Ausgabe, Saarland 2006

Bishop DK, Ear U, Bhattacharyya A, Calderone C, Beckett M, Weichselbaum RR, Shinohara A. XRCC3 is required for assembly of RAD51 complexes in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 21482-21488

Blasiak J, Przybylowska K, Czechowska A, Zadrozny M, Pertynski T, Rykala J, Kolacinska A, Morawiec Z, Drzewoski J. Analysis of the G/C polymorphism in the 5'-untranslated region of the RAD51 gene in breast cancer. *Acta Biochimica Polonica* 2003; 50: 249-253

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254

Bria E, Nistico C, Cuppone F, Carlini P, Ciccarese M, Milella M, Natoli G, Terzoli E, Cognetti F, Giannarelli D. Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer: pooled analysis of 15,500 patients. *Cancer* 2006; 11: 2337-2344

Buslov KG, Iyevleva AG, Chekmarinova EV, Suspitsin EN, Togo AV, Kuligina ESH, Sokolenko AP, Matsko DE, Turkevich EA, Lazareva YR, Chagunava OL, Bit-Sava EM, Semiglazov VF, Devilee P, Cornelisse C, Hanson KP, Imyanitov EN. NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia. *International Journal of Cancer* 2005; 114: 585-589

Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossmann S, Wahrer DCR, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingstone DM. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 2001, 105: 149-160

Carlomagno F, Chang-Claude J, Dunning AM, Ponder BA. Determination of the frequency of the common 657del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1999; 25: 393-395

Cartwright R, Tambini CE, Simpson PJ, Thacker J. The XRCC2 DNA repair gene from human and mouse encodes a novel member of the recA/RAD51 family. *Nucleic Acids Research*. 1998b; 26: 3084-3089

Chen C-F, Li S, Chen Y, Chen P-L, Sharp ZD, Lee W-H. The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin- α subunit of the nuclear transport signal receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 32863-32868

Chen C, Umezumi K, Kolodner RD. Chromosomal rearrangements in *S. cerevisiae* rfa1 mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair. *Molecular Cell* 1998a; 2: 9-22

Chen G, Yuan SS, Liu W, Xu Y, Yuan SS, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B, Cong F, Goff S, Wu Y, Arlinghaus R, Baltimore D, Gasser PJ, Park MS, Sung P, Lee EY. Radiation-induced assembly of RAD51 and RAD52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 12748-12752

Chen P-L, Chen C-F, Chen Y, Xiao J, Sharp ZD, Lee W-H. The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1998; 95: 5287-5292

Chen Y, Thompson R, Semenciw R, Mao Y. Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1999; 8: 855-861

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162: 156-159

Clarke C, Glaser SL, Uratsu CS, Selby JV, Larry H, Kushi LH, Herrinton LJ. Recent declines in hormone therapy utilization and breast cancer incidence: clinical and population based evidence. *Journal of clinical oncology* 2006; 24: pp e49-e50

Cobleigh MA, Langmuir VK, Sledge GW, Miller KD, Haney L, Novotny WF, Reimann JD, Vassel A. A phase I/II dose-escalation trial auf bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Seminars Oncology* 2003; 30: 117-124

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, ICRF Cancer Epidemiology Unit. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53.297 women with breast cancer and 100.239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996; 347: 1713-1727

Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of BRCA1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999; 286: 1162-1166

Crackower MA, Scherer SW, Rommens JM, Hui CC, Poorkaj P, Soder S, Cobben JM, Hudgins L, Evans JP, Tsui LC. Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development. *Human Molecular Genetics* 1996; 5: 571-579

Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with Ligase IV. *Current Biology* 1997; 7: 588

Cummings SR, Eckert S, Krüger KA. The effect of raloxifen on the risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple outcomes of raloxifen evaluation. *The Journal of the American Medical Association* 1999; 281: 2189-2197

Cuzick J. Aromatase inhibitors in prevention-data from ATAC (arimidex, tamoxifen alone or in combination) trial and the design of IBIS-II (the second International Breast Cancer Intervention Study). *Resent Results Cancer Research* 2003; 163: 96-103.

Dall P, Schütt G. Neue Entwicklungen der adjuvanten Mammakarzinombehandlung. *Der Gynäkologe* 2003; 36: 767-775

Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC. Role of BRCA2 in controle of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Molecular Cell* 2001; 7: 273-282

DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G. Synapsis of DNA ends by dependent protein kinase. *The EMBO Journal* 2002; 21: 3192-3200

Dosanjh MK, Collins DW, Fan WF, Lennon GG, Albala JS, Shen ZY, Schild D. Isolation and characterisation of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acids Research* 1998; 26: 1179-1184

Drouet J, Delteil C, Lefrancois J, Concannon P, Salles B, Calsou P. DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 7060-7069

Drouet J, Frit P, Delteil C, de Villartay J-P, Salles B, Calsou P. Interplay between Ku, Artemis and the DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit at DNA ends. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 27784-27793

Eakin CM, Maccoss MJ, Finney GL, Kleivit RE. Estrogen receptor (alpha) is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2007; 104: 5794-5799

Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy an hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365: 1687-1717.

Easton DF, Ford D, Bishop DT and the Breast Cancer Linkage Consortium. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. *American Journal of Human Genetics* 1995; 56: 265-271

Easton DF, Hopper JL, Thomas DC, Antoniou A, Pharoah PD, Whittemore AS, Haile RW. Breast cancer risks for BRCA1/2 carriers. *Science* 2004; 306: 2187-2191

Easashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, West SC. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 2005; 434: 598-604

Erkko H, Xia B, Nikkila J, Schleutker J, Syrjakoski K, Mannermaa A, Kallioniemi A, Pylkas K, Karppinen SM, Rapakko K, Miron A, Sheng Q, Li G, Mattila H, Bell DW, Haber DA, Grip M, Reiman M, Jukkola-Vuorinen A, Mustonen A, Kere J, Aaltonen LA, Kosma VM, Kataja V, Soini Y, Drapkin RI, Livingston DM, Winqvist R. *Nature* 2007; 446: 316-319

Eucker J, Emde A, Possinger K. Therapie des Mammakarzinoms. Vom Hormon bis zum Antikörper. *Internist* 2006; 48: 1223-1228

Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 2005; 434: 605-611

Figueiredo JC, Knight JA, Briollais L, Andrulis IL, Ozcelik H. Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3-T241M and the risk of breast cancer at the ontario site of breast cancer family registry. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2004; 13: 583-591

Figuroa JD, Malats N, Rothman N, Real FX, Silverman D, Kogevinas M, Chanock S, Yeager M, Welch R, Dosemeci M, Tardon A, Serra C, Carrato A, Garcia-Closas R, Castano-Vinyals G, Garcia-Closas M. Evaluation of genetic variation in the double-strand break repair pathway and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* 2007; 8: 1788-1793

Foray N, Randrianarison V, Marot D, Perricaudet M, Lenoir G, Feunteun J. Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 and BRCA2. *Oncogene* 1999; 18:7334-7342

Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE and the Breast Cancer Linkage Consortium. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet* 1994; 343: 692-695

Forget AL, Bennett BT, Kendall LK. XRCC3 is recruited to DNA double strand breaks early and independent of RAD51. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004; 93: 429-436

Fu YP, Yu J-C, Cheng T-C, Lou MA, Hsu G-C, Wu C-Y, Chen ST, Wu H-S, Wu P-E, Shen C-Y. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Research* 2003; 63: 2440-2446

Fuks F, Milner J, Kouzarides T. BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene* 1998; 17: 2531-2534

Garcia-Closas M, Egan KM, Newcomb PA, Brinton LA, Tritus-Ernstoff L, Chanock S, Welch R, Lissowska J, Peplonska B, Szeszenia-Dabrowska N, Zatonski W, Bardin-Mikolajczak A, Struwing JP. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland, and meta-analyses. *Human Genetics* 2006; 119: 376-388.

Gatei M, Young D, Cersaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to Radiation exposure. *Nature Genetics* 2000; 25: 115-119

Górski B, Cybulski C, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Jakubowska A, Stawicka M, Gozdecka-Grodecka S, Szwiec M, Urbanski K, Mitus J, Marczyk E, Dziuba J, Wandzel P, Surdyka D, Haus O, Janiszewska H, Debniak T, Toloczko-Grabarek A, Medrek K, Masojc B, Mierzejewski M, Kowalska E, Narod SA, Lubinski J. Breast cancer predisposing alleles in Poland. *Breast Cancer Research and Treatment* 2005; 92:19-24

Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR. Activity of DNALigase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 1997; 388: 492-495

Grischke E-M, Wallwiener D. Das Mammakarzinom an der Schwelle zum neuen Jahrtausend. *Der Gynäkologe* 2000; 33: 757-763

Gross PE, Sierra S. Current perspectives on Radiation-induced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16: 338-347

Hammersten O, Chu G. DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1998; 95: 525-530

Han J, Hankinson SE, Ranu H, De Vivo I, Hunter DJ. Polymorphisms in the DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the nurses' health study. *Carcinogenesis* 2004; 25: 189-195

Haraldsson K, Loman N, Zhang QX, Johannsson O, Olsson H, Borg A. BRCA2 germ-line mutations are frequent in male breast cancer patients without a family history of the disease. *Cancer Research* 1998; 58: 1367-1371

Hasselbach L, Haase S, Fischer D, Kolberg HC, Stürzbecher HW. Characterisation of the promoter region of the human DNA repair gene Rad51. *European Journal of Gynaecologic Oncology* 2005; 26: 589-598.

Hayes F, Cayan C, Barilla D, Monteiro AN. Functional assays for BRCA1: mutagenesis of the COOH-terminal region reveals critical residues for transcription activation. *Cancer Research* 2000; 60: 2411-2418

Healey EA, Cook EF, Orav EJ, Schnitt SJ, Connolly JL, Harris JR. Contralateral breast cancer: clinical characteristics and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology* 1993; 11: 1545-1552

Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hoctin-Boes G, Houghton J, Locker GY, Tobias JS; ATAC Trialists' Group. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 60-62

Hübbel VF, Rhiem K, Warm M, Mallmann P, Schmutzler RK. Aktuelle Entwicklung der Inzidenz und Mortalität beim Mammakarzinom. *Der Gynäkologe* 2003; 36: 746-752

Imyanitov EN, Hanson KP. Molecular pathogenesis of bilateral breast cancer. *Cancer Letters* 2003; 191: 1-7

Ioannidis JP, Trikalinos TA, Khoury MJ. Implications of small effect sizes of individual genetic variants on the design and interpretation of genetic association studies of complex diseases. *American Journal of Epidemiology* 2006; 164:609-614

Jacobsen NR, Nexø BA, Olsen A, Overvad K, Wallin H, Tjønneland A, Vogel U. No association between the DNA repair gene XRCC3 T241M polymorphism and risk of skin cancer and breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2003; 12: 584-585

Jakubowska A, Narod SA, Goldgar DE, Mierzejewski M, Masojc B, Nej K, Huzarska J, Byrski T, Gorski B, Lubinski J. Breast cancer risk reduction associated with the RAD51 polymorphism among carriers of the BRCA1 5382insC mutation in Poland. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2003; 12: 457-459

Kadouri L, Kote-Jarai Z, Hubert A, Durocher F, Abeliovich D, Glaser B, Hamburger T, Eeles RA, Peretz T. A single-nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies breast cancer risk in BRCA2 carriers, but not in BRCA1 carriers or noncarriers. *British Journal of Cancer* 2004; 90: 2002-2005.

Kahlenborn C, Modugno F, Potter DM, Severs WB. Oral contraceptive as a risk factor for premenopausal breast cancer: a metaanalysis. *Mayo Clinic Proceedings* 2006; 81: 1290-1302

Kang DH. Oxidative Stress, DNA damage, and breast cancer. *American Association of Critical-Care Nurses Clinical Issues* 2002; 13: 540-549

Karran P. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Current Opinion Genetics Development* 2000; 10: 144-150

Kastan MB, Lim DS. The many substrates and functions of ATM. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2000; 1: 179-186

Kim PM, Allen C, Wagner BM, Shen Z, Nickoloff JA. Overexpression of the human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: 4352-4360

King MC, Marks JH, Mandell JB; New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302: 643-646

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1971; 68: 820-823

Knippers R. *Molekulare Genetik*. Thieme Verlag 1990, 5. Auflage

Kurumizaka H, Ikawa S, Nakada M, Eda K, Kagawa W, Takata M, Takeda S, Yokoyama S, Shibata T. Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins XRCC3-RAD51C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2001; 98: 5538-5543

Kurumizaka H, Enomoto R, Nakada M, Eda K, Yokoyama S, Takehiko S. Region and aminoacid residues required for RAD51C binding in the human XRCC3 protein. *Nucleic Acids Research* 2003; 31: 4041-4050

Kuschel B, Auranen A, McBride S, Novik KL, Antoniou A, Lipscombe JM, Day NE, Easton DF, Ponder BAJ, Pharoah PDP, Dunning A. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Human Molecular Genetics* 2002; 11: 1399-1407

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

Lee KJ, Huang J, Takeda Y, Dynan WS. DNA Ligase IV and XRCC4 form a stable mixed tetramer that functions synergistically with other repair factors in a cell-free end-joining system. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 34787-34796

Lee KJ, Jovanovic M, Udayakumar D, Bladen CL, Dynan WS. Identification of DNA-PKcs phosphorylation sites on DNA endjoining in a cell-free system. *DNA Repair* 2004; 3: 267-276

Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, Dagan E, Paperna T, Kasinetz L, Catane R, Kaufmann B, Beller U, Renbaum P, Gershoni-Baruch R. A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2001; 98: 3232-3236

Li S, Ku C-Y, Farmer AA, Cong Y-S, Chen C-F, Lee W-H. Identification of a novel cytoplasmic protein that specifically binds to nuclear localization signal motifs. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 11: 6183-6189

Li S, Ting NS, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY, Lee WH. Functional links of BRCA1 and ataxia teleangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature* 2000; 406: 210-215

Li J, Zou C, Bai Y, Wazer DE, Band V, Gao Q. DSS1 is required for the stability of BRCA2. *Oncogene* 2006; 25: 1186-1194

Lieber MR, Ma Yunmei, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature Reviews* 2003; 4: 712-720

Lim DS, Hasty P. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Molecular Cell Biology* 1996; 16: 7133-7143

Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, Schild D, Tucker JD, Shen MR, Brookman KW, Siciliano MJ, Walter CA, Fan W, Narayana LS, Zhou ZQ, Adamson AW, Sorensen KJ, Chen DJ, Jones NJ, Thompson LH. XRCC2 and XRCC3, new human RAD51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Molecular Cell* 1998; 1: 783-793

Liu Y, West S. Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair. *Breast Cancer Research* 2002; 4: 9-13

Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 2002; 108: 781-794

Maacke H, Opitz S, Jost K, Hamdorf W, Henning W, Krüger S, Feller AC, Lopens A, Diedrich K, Schwinger E, Stürzbecher H-W. Over-expression of wild-type RAD51 correlates with histological Grading of invasiv ductal breast cancer. *International Journal of Cancer* 2000; 88: 907-913

Maculotti L, Gandini F, Pradella P. Bilateral breast carcinoma. 12 years' experience. *Minerva Chir.* 1996; 51: 33-37

Mahajan KN, Nick McElhinny SA, Mitchell BS, Ramsden DA. Association of DNA polymerase μ (pol μ) with Ku and ligase IV: role for pol μ in end-joining double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22: 5194-5202

Malmstrom P, Holmberg L, Anderson H, Mattsson J, Jonsson PE, Tennvall-Nittby L, Balldin G, Loven L, Svensson JH, Ingvar C, Moller T, Holmberg E, Wallgren A; Swedisch Breast Cancer Group. Breast conservation surgery, with and without radiotherapy, in women with lymph node-negative breast cancer: a randomised clinical trial in a population with access to public mammography screening. *European Journal of Cancer* 2003; 39: 1690-1697

Marmorstein LY, Kinev AV, Chan GK, Bochar DA, Beniya H, Epstein JA, Yen TJ, Shiekhattar R. A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. *Cell* 2001; 104: 247-257

Masson JY, Tarsounas MC, Stasiak AZ, Stasiak A, Shah R, McIlwraith MJ, Benson FE, West SC. Identifikation and purifikation of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes and Development.* 2001; 15: 3296-3307

Matsumoto Y, Suzuki N, Namba N, Umeda N, Ma X-J, Morita A, Tomita M, Enomoto A, Serzawa S, Hirano K, Sakai K, Yasuda H, Hosoi Y. Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS Letters* 2000; 478: 67-71

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrisson P, Rostek P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick MH. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266:66-71

Modesti M, Junop MS, Ghirlando R, van de Rakt M, Gellert M, Yang W, Kannar R. Tetramerization and DNA ligase IV interaction of the DNA double-strand break repair protein XRCC4 are mutually exclusive. *Journal of Molecular Biology* 2003; 334: 215-228

Morales M, Theunissen J-WF, Bender Kim CF, Kitagawa R, Kastan MB, Petrini JHJ. The RAD50^S allele promotes ATM-dependent DNA damage response and suppresses ATM deficiency: implications for the MRE11 complex as a DNA damage sensor. *Genes and development* 2005; 19: 3043-3054

Mose S, Adamietz A, Thilmann C, Saran F, Pahnke R, Böttcher HD. Die Prognose des bilateralen Mammakarzinoms im Vergleich zum unilateralen Mammatumor. *Strahlentherapie und Onkologie* 1995; 171: 207-213

Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, de Villartay JP. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 2001; 105: 177-186

Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. BRCA1 controls homology-directed DNA-repair. *Molecular Cell* 1999; 4: 511-518

Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA. Specific enzymatic amplifikation of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1986; 51:263-273

Nabholtz J. Phase III trial comparing TAC (docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide) with FAC (5-fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide) in the adjuvant treatment of node positive breast cancer (BC) patients: interim analysis of BCIRG 001 study. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 2002; 21:141

Neitzel H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Human Genetics* 1986; 73: 320-326.

Ogawa T, Yu X, Shinohara A, Egelman EH. Similarity of yeast RAD51 filament to bacterial RecA filament. *Science* 1993; 259: 1896-1899

Ortmann O, König K. Hormontherapie im Klimakterium und in der Postmenopause. *Deutsches Ärzteblatt* 2005; 3: 120-123

Papelard H, de Bock GH, van Eijk R, Vliet-Vlieland TP, Cornelisse CJ, Devilee P, Tollenaar RA. Prevalance of BRCA1 in a hospital-based population of Dutch breast cancer patients. *British Journal Cancer* 2000; 83: 719-724

Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, Venkitaraman AR. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 2002; 420: 287-293

Pfleiderer A, Breckwoldt M, Martius G. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 3. Auflage, Thieme-Verlag, 1999

Pharoah P, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BAJ. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nature Genetics* 2002; 31: 33-36

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschhoff J, Suto T, Grotzer T, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2005; 353: 1659-1672.

Pittmann DL, Schimenti JC. Mid-gestation lethality in mice deficient for the recA-related gene, RAD51D/RAD51L3. *Genesis* 2000; 26: 167-173

Preiß JC, Dornoff W, Hagmann FG, Schmieder A. *Onkologie 2004/05. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie*. 12. Auflage, aktualisierter Nachdruck 2005, Zuckschwerdt Verlag

Raderschall E, Golub EI, Haaf T. Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1999; 96: 1921-1926

Raderschall E, Bazarov A, Cao J, Lurz R, Smith A, Mann W, Ropers HH, Sedivy JM, Golub EI, Fritz E, Haaf T. Formation of higher-order nuclear RAD51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *Journal of Cell Science* 2002a; 115:153-164

Raderschall E, Stout K, Freier S, Suckow V, Schweiger S, Haaf T. Elevated Levels of RAD51 recombination Protein in tumor cells. *Cancer Research* 2002b; 62: 219-225.

Raffi S, O'Reagan P, Xinarianos G, Azmy I, Stephenson T, Reed M, Meuth M, Thacker J, Cox A. A potential role for the XRCC2 R188H polymorphic site in DNA-damage repair and breast cancer. *Human Molecular Genetics* 2002; 11:1433-1438

Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, Reid S, Spanova K, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, McGuffog L, Hanks S, Evans DG, Eccles D. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature Genetics* 2007; 39: 165-167

Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT, Neuhausen SL, van't Veer L, Garber JE, Evans GR, Narod SA, Isaacs C, Matloff E, Daly MB, Olopade OI, Weber BL. Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: The PROSE Study Group. *Journal Clinical Oncology* 2004; 22: 1055-1062

Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, North B, Jayatilake H, Barfoot R, Spanova K, McGuffog L, Evans DG, Eccles D, Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N. *Nature Genetics* 2006; 38: 873-875

Richardson C, Stark JM, Ommundsen M, Jasin M. RAD51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene* 2004; 23: 546-553.

Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nature Genetics* 1996; 14: 185-7

Roth DB, Wilson JH. Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Molecular Cell Biology* 1986; 6: 4295-4304

Ruffner H, Joazeiro CAP, Hemmati D, Hunter T, Verma IM. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2001; 98: 5134-5139

Sanger F, Nicklein S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1977; 74: 5463-5467.

Sauer H. Mammakarzinome Manual. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 10. überarbeitete Auflage 2005, Zuckschwerdt Verlag

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotmann G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NGJ, Taylor AMR, Arlett CF, Miki T, Weissmann SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995a; 268: 1749-1753

Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Siloh Y, Rotman G. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Human Molecular Genetics* 1995b; 4 : 2025-2032

Schaeper U, Subramanian T, Lim L, Boyd JM, Chinnadurai G. Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 15: 8549-8552.

Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, Ahmed M, Spanova K, North B, McGuffog L, Evans DG, Eccles D, Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nature Genetics* 2006; 38: 1239-1241

Seemanova E, Passarge E, Benesova J, Houstek J, Kasal P, Sevcikova M. Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder. *Cancer Research* 1985; 20: 639-648

Seemanova E. An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. *Mutation Research* 1990; 238: 321-324

Seemanova E, Pelz J, Varon R, Jarolim P, Sperling K. Cancer risk in NBS heterozygotes. *European Journal of Human Genetics* 2001; 9: 106

Schild D, Lio YC, Collins DW, Tsomondo T, Chen DJ. Evidence for simultaneous protein interactions between human RAD51 paralogs. *Journal of Biological Chemistry.* 2000; 275: 16443-16449.

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingstone DM. Association of BRCA1 with RAD51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997; 88: 265-275

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine* 2001; 344: 783-792

Steffen J, Nowakowska D, Niwinska A, Czapeczak D, Kluska A, Piatkowska M, Wisniewska A, Paszko Z. Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland. *International Journal of Cancer* 2006; 119: 472-475

Steinmann D, Bremer M, Rades D, Skawran B, Siebrands C, Karstens JH, Dörk T. Mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes in patients with bilateral breast cancer. *British Journal of Cancer* 2001; 85: 850-858

Sung P. Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* 1994; 265: 1241-1243

Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL. Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *New England Journal of Medicine* 1987; 316: 1289-1294

Taalman RDFM, Hustix TWJ, Weemaes CRM, Seemanova E, Schmidt A, Passarge E, Scheres JM. Further delineation of the Nijmegen breakage syndrome. *Cancer Research* 1989; 32: 425-431

Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Opinion: Candidate-gene approaches for studying complex genetics traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics* 2002; 3: 391-397.

Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, Fukushima T, Sonoda E, Schild D, Thompson LH, Takeda S. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five RAD51 paralogs. *Molecular Cell Biology* 2001; 21: 2858-2866

Tambini CE, George AM, Rommens JM, Tsui L-C, Scherer SW, Thacker J. The XRCC2 DNA repair gene: Identification of a positional candidate. *Genomics* 1997; 41: 84-92

Tebbs RS, Zhao Y, Tucker JD, Scheerer JB, Siciliano MJ, Hwang M, Liu N, Legerski RJ, Thompson LH. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1995; 92: 6354-6358

Tsuzucki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, Morita T. Targeted disruption of the RAD51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1996; 93: 6236-6240.

Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 1998; 93: 467-476

Venkitaraman, AR. Cancer Susceptibility and Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002; 108:171-182

Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2002; 347: 1227-1232

Vispé S, Cazaux C, Lesca C, Defais M. Overexpression of the RAD51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Research* 1998; 26: 2859-2864

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 2001; 412: 607-614

Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes and Development* 2000; 14: 927-939

Wang WW, Spurdle A, Kolachana P, Bove B, Modan B, Ebbers SM, Suthers G, Tucker A, Kaufmann DJ, Doody MM, Tarone RE, Daly M, Levavi H, Pierce H, Chetrit A, kConFab, ABCFS/CFRBCS, AJBCS, NISOC, Yechezkel GH, Chenvix-Trench G, Offit K, Godwin AK, Struewing P. A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of Cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2001; 10: 955-960

Webb PM, Hopper JL, Newman B, Chen X, Kelemen L, Giles GG, Southey MC, Chenevix-Trench G, Spurdle A. Double-strand break repair gene polymorphisms and risk of breast or ovarian cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2005; 14: 319-323

Weemaes CMR, Hustinx TWJ, Schreeres JMJC, van Munster PJJ, Bakkeren JAJM, Taalman RDFM. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *ACTA Paediatrica Scandinavica* 1981; 70: 557-564

Weiss J.M., Diedrich K., Ortmann O. Chemoprävention des Mammakarzinoms durch Tamoxifen und Raloxifen. *Der Gynäkologe* 2003; 36: 97-102

Welsh PL, King M-C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics* 2001; 10: 705-713

West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003; 4 : 1-11

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Shift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-792

Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature Genetics* 1996; 14: 430-440

www.aerzteblatt.de. Meta-Analyse: Prämenopausales Mammakarzinom durch lange Einnahme der Anti-Baby-Pille vor der ersten Schwangerschaft, 31. 10. 2006

www. aerztezeitung.de. Lapatinib bremst Tumorwachstum bei Mamma-Ca, 08.06.2006

www.cancer.gov/newscenter/pressreleases. Results of the Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) Released. Osteoporosis Drug Raloxifen Shown to be as Effective as Tamoxifen in Preventing Invasive Breast Cancer, 21.06.2006

Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nature Genetics* 2002; 30: 285-289

Yu Y, Wang W, Ding Q, Ruiqiong Y, Chen D, Merkle D, Schriemer D, Meek K, Lees-Miller SP. DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination. *DNA Repair* 2003; 2: 1239-1252

Yu X, Wu LC, Bowcock AM, Aronheim A, Baer R. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a Protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *The journal of biological chemistry* 1998; 273:25388-25392

Yurchenko V, Xue Z, Sadofsky MJ. SUMO modification of human XRCC4 regulates its localization and function in DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* 2006; 26: 1786-1794

Zhong Q, Boyer TG, Chen P-L, Lee W-H. Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from BRCA1-null fibroblasts. *Cancer Research* 2002; 62: 3966-3970.

8 Anhang

8.1 Übersicht Bilateral- und Unilateral-Kollektiv

Kollektiv der bilateral betroffenen Patientinnen	Vergleichskollektiv unilateral betroffener Patientinnen	Kollektiv der bilateral betroffenen Patientinnen	Vergleichskollektiv unilateral betroffener Patientinnen	Kollektiv der bilateral betroffenen Patientinnen	Vergleichskollektiv unilateral betroffener Patientinnen
B-Nummer	A-Nr.	B-Nummer	A-Nr.	B-Nummer	A-Nr.
1	357	48	102	94	15
2	514	49	231	95	168
3	192	50	459	96	173
5	14	51	301	97	38
6	229	52	105	98	151
8	101	54	316	100	142
9	1	56	1208	101	313
11	174	57	241	102	221
12	153	58	133	103	320
14	135	59	165	104	122
15	140	60	187	105	394
16	220	61	166	106	213
17	210	62	311	107	178
18	225	63	175	108	125
19	131	64	158	109	1207
20	170	65	27	110	190
21	164	66	159	111	2
23	366	67	216	112	134
24	205	69	230	113	30
25	181	70	35	114	376
26	104	71	172	115	398
28	19	72	208	116	18
29	149	73	148	117	228
30	206	74	154	118	687
31	37	76	222	119	195
32	167	77	8	120	359
33	204	78	33	121	11
34	31	79	162	122	199
35	218	80	191	123	163
36	119	82	247	124	503
37	194	83	176	125	497
38	217	84	10	126	772
39	242	85	124	128	448
40	5	86	34	129	433
42	147	87	152	131	143
43	240	88	161	132	510
44	121	89	196	133	460
45	212	90	562	134	543
46	150	91	169	136	440
47	54	93	238	137	393

Tabelle 48: Abgleich bilaterales und unilaterales Brustkrebskollektiv

8.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

abs.	absolut
As	Aminosäure(n)
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Ataxia teleangiectatica, synonym Louis-Bar-Syndrom
bidest.	bidestilliert
Bilat.	Bilateral
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSS	balanced salt solution, physiologische Elektrolytlösung
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre DNA
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
D-	rechtsdrehend (z.B. Glucose)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
evtl.	eventuell

FKS	Foetales Kälberserum
g	Gramm
	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GTC	Guanidiniumthiocyanat
GTS	Glycin-Tris-SDS
Gy	Gray
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
	Leerwert
HCl	Salzsäure
histol.	histologisch
HPLC	„high performance liquid chromatography“
HPLC-Wasser	hoch aufgereinigtes Wasser, das für die HPLC geeignet ist
HR	homologer Rekombinationsreparaturweg
HRP	Meerrettich-Peroxidase
inkl.	inklusive
k-	kilo-
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L (l)	Liter
L-	linksdrehend (z.B. Glukose)
m	Meter
M	molar
m-	milli-
mAK	monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
MeSH	Mercaptoethanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MnCl ₂	Manganchlorid

μ -	mikro-
n-	nano-
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ EDTA	Natrium-EDTA
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NBSLD	„NBS-like disease“
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NHEJ	„Non homologous end-joining“, illegitime Rekombinationsreparatur
NP-40	Nonidet P-40
Nr.	Nummer
p-	pico-
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	„phosphate buffered saline“, mit Phosphat gepufferte Salzsäure
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase Kettenreaktion
pH	<i>pondus hydrogenii</i> , negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“, Rotationen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunden
STE	Sodium-Tris-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxyethylamin
TU	Tumor
U	„unit“, Einheit

ü.N.	über Nacht
Unilat.	Unilateral
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

8.3 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Komponenten der Signalwege in der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (modifiziert nach Kuschel et al., 2002)</i>	17
<i>Abbildung 2: Funktionelle Domänen von BRCA1 (nach West, 2003)</i>	20
<i>Abbildung 3: Funktionelle Domänen von BRCA2 (nach West, 2003)</i>	22
<i>Abbildung 4: Interaktionen zwischen RAD51, XRCC3 und RAD51C (nach Forget et al., 2004)</i>	24
<i>Abbildung 5: „Non-homologous DNA end-joining“ (NHEJ) Signalweg (nach Lieber et al., 2003)</i>	28
<i>Abbildung 6: Modell für die Interaktion zwischen DNA-PKcs und ARTEMIS in Anwesenheit der DNA-Doppelstrangbruchregion (nach Drouet et al., 2006)</i>	29
<i>Abbildung 7: Mutationsscreening RAD51, XRCC2 und XRCC3</i>	76
<i>Abbildung 8: Sequenzierung der RAD51-Promotorregion</i>	78
<i>Abbildung 9: Sequenz in Intron 3 (Sinnstrang)</i>	80
<i>Abbildung 10: Sequenz in Exon 4 (Sinnstrang)</i>	81
<i>Abbildung 11: Sequenz in Intron7/Exon8 (Sinnstrang)</i>	82
<i>Abbildung 12: Sequenz in Exon 8</i>	83
<i>Abbildung 13: Substitution XRCC4*c.1134T (c.401T>C) nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit Pst I</i>	85
<i>Abbildung 14: Testverfahren für die Spleißmutation nach IVS7-IG>A; Restriktion mit Tsp509 I</i>	86
<i>Abbildung 15: Polymorphismus XRCC4*c.921T>G nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit Taq^α I</i>	87
<i>Abbildung 16: RT-PCR-Analyse RAD51 nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit ScrF I</i>	88
<i>Abbildung 17: Densitometrische Auswertung des Agarosegels mit Analyseprogramm Grabber V3.01</i>	89
<i>Abbildung 18: Sequenz der RAD51-Promotorvariante nach RT-PCR</i>	90
<i>Abbildung 19: Western Blot-Analyse des RAD51-Proteins</i>	91
<i>Abbildung 20: Sequenz von Proben mit der Spleißmutation XRCC4*IVS7-IG>A nach RT-PCR</i>	93
<i>Abbildung 21: Kapillarelektrophoretische Trennung der RT-PCR-Produkte zum quantitativen Nachweis des aberranten Spleißens im Exon 8 bei Trägern der Mutation IVS7-IG>A</i>	94
<i>Abbildung 22: Western Blot-Analyse I des XRCC4-Proteins</i>	96
<i>Abbildung 23: Western Blot Analyse II des XRCC4-Proteins</i>	97

8.4 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Klinische Charakteristika nach paarweisem Abgleich der Bilateral- und Unilateral-Kollektive</i>	35
<i>Tabelle 2: Lysepuffer zur DNA-Isolierung</i>	46
<i>Tabelle 3: 10 x STE-Puffer für Proteinase K</i>	46
<i>Tabelle 4: Proteinase K-Ansatz</i>	46
<i>Tabelle 5: Phenol-Chloroform-Isoamyl-Gemisch</i>	46
<i>Tabelle 6: 10 x TE-Puffer</i>	47
<i>Tabelle 7: Waschlösung BSS</i>	48
<i>Tabelle 8: Lysepuffer zur RNA-Isolierung</i>	48
<i>Tabelle 9: Reagenzien zur RNA-Extraktion</i>	48
<i>Tabelle 10: PEG-Lösung</i>	49
<i>Tabelle 11: Standardprogrammablauf zur PCR</i>	51
<i>Tabelle 12: Verwendete PCR-Ansätze</i>	52
<i>Tabelle 13: Veränderte Reaktionsbedingungen bei Anwendung der „Hot-Start“-Taq-Polymerase</i>	52
<i>Tabelle 14: PCR-Primer zur Amplifikation, Sequenzierreaktion und Fragmentlängenanalyse</i>	52
<i>Tabelle 15: 15 µl Ansatz für eine restriktionsenzymatische Spaltung</i>	55
<i>Tabelle 16: Mit Restriktionsenzymen getestete Mutationen/Polymorphismen</i>	55
<i>Tabelle 17: Angewandte Reaktionsbedingungen</i>	55
<i>Tabelle 18: NEBuffer 1</i>	56
<i>Tabelle 19: NEBuffer 3</i>	56
<i>Tabelle 20: NEBuffer 4</i>	56
<i>Tabelle 21: NEBuffer Taq I</i>	56
<i>Tabelle 22: Agarosegel-Konzentration und angegebener Trennbereich bei Gelelektrophorese in 1x TBE</i>	58
<i>Tabelle 23: Gellösungen</i>	59
<i>Tabelle 24: Auftragpuffer</i>	59
<i>Tabelle 25: 300 ng kb-Leiter</i>	59
<i>Tabelle 26: Verwendete Gellösungen</i>	61
<i>Tabelle 27: Verwendete Ladungs- und Elektrodenpuffer</i>	61
<i>Tabelle 28: 10 µl Ansatz zur Sequenzierreaktion</i>	63
<i>Tabelle 29: Sequenzier-Programm im Temperaturprozessor</i>	63
<i>Tabelle 30: 10 µl Reaktionsansatz zur Lambda-Protein-Phosphatase-Behandlung</i>	67
<i>Tabelle 31: Lysispuffer</i>	68
<i>Tabelle 32: Standardmessreihe</i>	69
<i>Tabelle 33: Transferpuffer (1 x Carbonat-Puffer)</i>	71
<i>Tabelle 34: Blocking-Lösung</i>	71
<i>Tabelle 35: Wasch-Lösung</i>	72
<i>Tabelle 36: Verwendete Antikörper-Lösungen</i>	72
<i>Tabelle 37: Zusammenstellung der Allelfrequenzen</i>	98
<i>Tabelle 38: Signifikanzniveaus (p-Werte) bei Vergleich der Allelhäufigkeiten</i>	98
<i>Tabelle 39: Odds Ratios für jedes veränderte Allel im Vergleich zum Wildtyp</i>	99

<i>Tabelle 40: Odds Ratios für ein verändertes Allel im Vergleich zum Wildtyp.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabelle 41: Odds Ratios für Homozygotie im Vergleich zum Wildtyp.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabelle 42: Einfluss der Genvarianten auf den LK-Status.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabelle 43: Einfluss der Genvarianten auf das Grading histol. invasiv duktaler Mammakarzinome.....</i>	<i>103</i>
<i>Tabelle 44: Einfluss der Genvarianten auf das Tumorstadium des Mammakarzinoms.....</i>	<i>104</i>
<i>Tabelle 45: Einfluss der Genvarianten auf den Fernmetastasenstatus.....</i>	<i>105</i>
<i>Tabelle 46: Genvarianten und deren Assoziation zum mittleren Alter bei Erstdiagnose.....</i>	<i>107</i>
<i>Tabelle 47: Assoziation der Genvarianten zur Familienanamnese.....</i>	<i>109</i>
<i>Tabelle 48: Abgleich bilaterales und unilaterales Brustkrebskollektiv.....</i>	<i>143</i>

9 Lebenslauf

Vor- und Nachname:	Katrin Gerriets
Geburtsdatum:	08. August 1976
Geburtsort:	Wilhelmshaven
Familienstand:	ledig
Schulausbildung:	
1983-1996	Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Wilhelmshaven
1996	Abitur, in Wilhelmshaven
Studium:	
1998-2000	Studiengang Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg
2000	Physikum, in Marburg
2000-2004	Studiengang Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover
2001	Erstes Staatsexamen, in Hannover
2003	Zweites Staatsexamen, in Hannover
2004	Drittes Staatsexamen, in Hannover
2004	Ärztliche Prüfung und Approbation, in Hannover
Beruf:	
seit 2005	Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik II für Herz-, Lungen- und Gefäßerkrankungen des Städtischen Klinikum Braunschweig
01-06 2006	Rotation in die Medizinische Klinik III für Hämatologie und Onkologie des Städtischen Klinikum Braunschweig
Promotion:	
seit 2001	Doktorandin in der Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Medizinischen Hochschule Hannover
Unterschrift:	

10 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Bendix-Waltes R, Gerriets K, Beußel S, Bodganova N, El-Harith A E-H, Gutierrez Enriquez S, Hall J, Bremer M, Dörk T. A frequent splicing mutation of XRCC4: implications for breast cancer? *Medizinische Genetik* 2003; 3: 294

Bremer M, Steinmann D, Gerriets K, Dörk T, Karstens JH. Prävalenz von BRCA-1/2-Genmutationen und Lokalrezidiv nach Strahlentherapie bei 109 Patientinnen mit bilateralem Brustkrebs. *Strahlentherapie und Onkologie* 2002; 178 (Sondernr.1): 13

Bremer M, Steinmann D, Gerriets K, Dörk T, Karstens JH. Bilateral breast cancer and local relapse: a hospital-based study of the prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2002; Supplement to Volume 128: 46

Gerriets K, Bremer M, Hector A, Steinmann D, Karstens JH, Dörk T. Variations of DNA double strand break repair genes in 120 patients with bilateral breast cancer. *Medizinische Genetik* 2002; 3: 271

Gerriets K, Bendix-Waltes R, Bremer M, Hasselbach L, Stürzbecher H-W, Dörk T. RAD51 promotor variant 135 G>C: increased RAD51 expression, but no general association with breast cancer. *Medizinische Genetik* 2003; 3: 294

The Breast Cancer Association Consortium (BCAC): Australian Breast Cancer Family Study: Chenevix-Trench G, Hopper JL, Spurdle AB, Chen X; British Breast Cancer Study: Fletcher O, Johnson N, Palle C, Peto J, dos Santos Silva I; Copenhagen Breast Cancer Study: Bojesen SE, Axelsson CK, Nordestgaard BG; GENICA: Hamann U, Rashid MU, Justenhoven C, Brauch H, Ko Yon, Pesch B; Hannover Bilateral Breast Cancer Study: Dörk T, Beussel S, Gerriets K, Bremer M; Heidelberg Under 50 Breast Cancer Study: Chang-Claude J, Wang-Gohrke S; Helsinki Breast Cancer Study: Nevanlinna H, Tommiska J, Fagerholm R, Blomqvist C; IARC-Thai: Hughes D, Odefrey F, Gaborieau V, Brennan P, Sangrajrang S; Kuopio Breast Cancer Project: Mannermaa A, Kataja V, Kosma V-M; Mayo Clinic Breast Cancer Study: Couch FJ, Goode EL, Olson J, Sellers TA; NCI Polish Breast Cancer Study: Garcia-Closas M, Lissowska J, Chanock S, Peplonska B; US Three-State Breast Cancer Study: Garcia-Closas M, Egan KM, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L;

SEARCH: Pharoah P, Easton D, Dunning A, Ponder B; Seoul Breast Cancer Study: Kang D, Noh D-Y, Yoo K-Y, Ahn AH; Sheffield: Cox A, Reed MWR, Balasubramanian SP, Rafii S, MacPherson G, Lin W-Y; Spanish National Cancer Center: Benitez J, Milne R; U.S. Radiology Technologists Study: Sigurdson AJ, Mateus Pereira LH, Doody MM, Struewing JP. Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the Breast Cancer Association Consortium. Journal of the National Cancer Institute 2006; 98: 1382-1396

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Varianten der Reparaturgene *RAD51*, *XRCC2*, *XRCC3* und *XRCC4* beim bilateralen Mammakarzinom“ in der Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Herrn Dr. Thilo Dörk ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hannover, den 29.08.2007

(Katrín Gerriets)