

Aus dem Institut für Humangenetik
(Direktor: Prof. Dr. Reiner Siebert)
des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

DNA-METHYLIERUNG
AUSGEWÄHLTER BRCA- UND FANCONI ANÄMIE-GENE
BEIM FAMILIÄREN MAMMAKARZINOM

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ROBIN ZAZOFF

aus Hamburg

Kiel 2013

1. Berichterstatter: PD Dr. H. Tönnies
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Mundhenke
Tag der mündlichen Prüfung: 7.1.2014
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 4.10.2013
gez.: Prof. Dr. O. Ammerpohl

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS FAMILÄRE MAMMAKARZINOM.....	1
1.2	TUMORENTSTEHUNG	2
1.3	EPIGENETISCHE MECHANISMEN DER GENREGULATION	2
1.4	DIE FANCONI ANÄMIE-GENE.....	3
1.5	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	5
2	MATERIAL UND METHODEN.....	6
2.1	MATERIAL	6
2.1.1	<i>Untersuchungskollektiv und Kontrollen.....</i>	<i>6</i>
2.1.2	<i>Technische Kontrollen für die Bisulfit-Pyrosequenzierung.....</i>	<i>9</i>
2.1.3	<i>Reagenzien und Kits.....</i>	<i>9</i>
2.1.4	<i>Geräte.....</i>	<i>10</i>
2.1.5	<i>Puffer und Lösungen</i>	<i>10</i>
2.1.6	<i>Primer für die Kontrollgen-PCR.....</i>	<i>11</i>
2.1.7	<i>Primerdesign und Primersequenzen</i>	<i>11</i>
2.2	METHODEN.....	13
2.2.1	<i>Bestimmung des Tumorzellgehalts der Paraffinschnitte (FFPE).....</i>	<i>13</i>
2.2.2	<i>Anreicherung des Tumorzellgehalts.....</i>	<i>14</i>
2.2.3	<i>DNA-Extraktion aus FFPE-Tumorgewebe.....</i>	<i>14</i>
2.2.4	<i>DNA-Extraktion aus kultivierten Zellen und kryokonserviertem Gewebe.....</i>	<i>14</i>
2.2.5	<i>DNA-Quantifizierung, -Reinheit und Kontrollgen-PCR.....</i>	<i>15</i>
2.2.6	<i>Gelelektrophorese genomischer DNA</i>	<i>15</i>
2.2.7	<i>Natriumbisulfitkonversion.....</i>	<i>15</i>
2.2.8	<i>PCR der natriumbisulfitkonvertierten DNA</i>	<i>15</i>
2.2.9	<i>Bisulfit-Pyrosequenzierung</i>	<i>16</i>
2.2.10	<i>Sanger-Sequenzierung.....</i>	<i>18</i>
2.2.11	<i>PCR des BRCA2-(FANCD1) Gens für die Sanger-Sequenzierung.....</i>	<i>18</i>
3	ERGEBNISSE	20
3.1	ANALYSE REGULATORISCHER REGIONEN	20
3.2	UNTERSUCHUNG DES DEGRADATIONSGRADES DER DNA DES FFPE-TUMORGEWEBES.....	21
3.3	OPTIMIERUNG DER ASSAYS ZUR METHYLIERUNGSANALYSE VON <i>BRCA</i> - UND FANCONI ANÄMIE-GENEN.....	22
3.4	DEFINITION DIFFERENTIELLER DNA-METHYLIERUNG	23
3.5	VORUNTERSUCHUNGEN ZUR AUSWAHL INFORMATIVER ASSAYS	23
3.6	ERGEBNISSE DER PYROSEQUENZIERUNGS-ASSAYS OHNE HINWEIS AUF DIFFERENTIELLE METHYLIERUNG VON TUMOREN UND MAMMAKARZINOMZELLINIEN	23

3.7	ERGEBNISSE DER PYROSEQUENZIERUNGS-ASSAYS MIT DIFFERENTIELLER METHYLIERUNG VON TUMOREN UND MAMMAKARZINOMZELLINIEN	25
3.7.1	<i>DNA-Methylierung des FANCA-Gens</i>	25
3.7.2	<i>DNA-Methylierung des FANCB-Gens</i>	28
3.8	ABHÄNGIGKEIT DER MESSBAREN DNA-METHYLIERUNG VOM TUMORZELLGEHALT IN PARAFFINSCHNITTEN	32
3.9	PYRO- UND SANGER-SEQUENZIERUNG DES <i>BRCA2-(FANCD1)</i> GENS	35
4	DISKUSSION	37
4.1	FANCONI ANÄMIE UND MAMMAKARZINOM	39
4.2	DNA-METHYLIERUNG IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN	40
4.3	DEFINITION DIFFERENTIELLER DNA-METHYLIERUNG	40
4.4	UNTERSUCHUNG VON DNA-METHYLIERUNG IN ZELLINIEN	41
4.5	AUSWAHL VON KONTROLLEN DER DNA-METHYLIERUNG DES TUMORGEWEBES	42
4.6	BISULFIT-PYROSEQUENZIERUNG ALS GEEIGNETE METHODE ZUR QUANTIFIZIERUNG DER DNA-METHYLIERUNG	42
4.7	PROBLEME DER UNTERSUCHUNGEN AN FFPE-TUMORGEWEBE.....	43
4.8	WEITERE PROBLEME DER ASSAY-OPTIMIERUNG.....	44
4.8.1	<i>DNA-Methylierung des BRCA1-Gens</i>	45
4.8.2	<i>Pyrosequenzierung und Sanger-Sequenzierung des BRCA2-(FANCD1) Gens</i>	46
4.9	ERGEBNISSE DER ASSAYS OHNE DIFFERENTIELLE DNA-METHYLIERUNG	47
4.9.1	<i>Bedeutung einzelner differentiell methylierter CpGs</i>	47
4.9.2	<i>DNA-Methylierung des FANCC-Gens</i>	48
4.9.3	<i>DNA-Methylierung des FANCN- (PALB2) Gens</i>	48
4.9.4	<i>DNA-Methylierung des FANCD2-, FANCL- und FANCI- (BRIP1) Gens</i>	49
4.10	DIFFERENTIELLE DNA-METHYLIERUNG DES <i>FANCA-</i> UND <i>FANCB-</i> GENS.....	49
4.10.1	<i>Methylierung des FANCA-Gens in Tumoren</i>	49
4.10.2	<i>Methylierung des FANCA-Gens in Mammakarzinomzelllinien</i>	51
4.10.3	<i>Methylierung des FANCB-Gens in Tumoren</i>	52
4.10.4	<i>Methylierung des FANCB-Gens in Mammakarzinomzelllinien</i>	54
4.10.5	<i>Methylierung des FANCA-Gens und FANCB-Gens im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen</i>	54
4.10.6	<i>Einfluss des Tumorzellgehalts in Paraffinschnitten auf die gemessene DNA-Methylierung</i>	55
4.11	AUSBLICK.....	56
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	58
6	LITERATURVERZEICHNIS	60
7	ANHANG	68
8	DANKSAGUNG	87
9	CURRICULUM VITAE	88

Abkürzungsverzeichnis

<i>BRCA</i>	Brustkrebsgene (engl. <u>b</u> reast <u>c</u> ancer)
BRIP1	<u>BR</u> CA1- <u>i</u> nteragierendes <u>P</u> rotein (FAN <u>C</u> J) (engl. <u>BR</u> CA1- <u>i</u> nteracting protein)
CDS	Kodierende Sequenz (engl. <u>C</u> oding- <u>S</u> equ <u>e</u> nce)
CpG	<u>C</u> ytosin-phosphatidyl- <u>G</u> uanin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <u>D</u> esox <u>y</u> nucleic <u>a</u> cid)
FAAP	<u>F</u> anconi <u>A</u> nämie assoziiertes <u>P</u> rotein
FANC	<u>F</u> anconi Anämie (Gen/Protein)
FFPE	Formalin fixiert und in Paraffin gebettet (engl. <u>F</u> ormalin <u>F</u> ixed <u>P</u> araffin <u>E</u> MBEDDED)
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
Her2/neu	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (engl. <u>H</u> uman <u>E</u> pidermal Growth Factor <u>R</u> eceptor <u>2</u>)
k	kilo- (10^3)
kb	Kilobasen
m	milli- (10^{-3})
mK	methylierte Kontrolle
MW	Mittelwert
μ	mikro- (10^{-6})
n	nano- (10^{-9})
ÖR	<u>Ö</u> strogen <u>r</u> ezeptor
PALB2	Partner und Lokalisierer von BRCA2 (FAN <u>C</u> N) (engl. <u>P</u> artner <u>a</u> nd <u>l</u> ocalizer of <u>BR</u> CA <u>2</u>)
PCR	Polymerasenkettenreaktion (engl. <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PR	<u>P</u> rogesteron <u>r</u> ezeptor
SP	<u>S</u> plice-Site Variante der <i>BRCA1</i> -Mutation
STABW	Standardabweichung
STR	Kurze Tandemwiederholungen (engl. <u>S</u> hort <u>t</u> andem <u>r</u> epeats)
UTR	Untranslatierter Bereich (engl. <u>U</u> n <u>t</u> ranslated <u>R</u> egion)
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Das familiäre Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist in Deutschland und in der gesamten westlichen Welt der häufigste bösartige Tumor bei Frauen. Etwa jede zehnte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom, wobei die Zahl der Erkrankungen mit zunehmendem Alter ansteigt (Husmann et al., 2006). Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms sind: fortgeschrittenes Alter, positive Familienanamnese, hoher Östrogenspiegel (frühe Menarche, späte Menopause, Nullipara) sowie Adipositas und Diabetes mellitus, häufig bedingt durch westliche Ernährungsgewohnheiten (Gerber, 2008). 90 % aller Mammakarzinome treten sporadisch auf, d.h. ohne familiäre Häufung. Die restlichen zehn Prozent der Brustkrebserkrankungen sind familiäre Formen, die auf einer familiären Disposition beruhen (Übersicht in: Diedrich et al., 2006).

Die familiären Formen des Mammakarzinoms werden zum größten Teil durch Keimbahnmutationen in disponierenden Genen hervorgerufen. Etwa die Hälfte dieser hereditären Mammakarzinome entstehen durch Mutationen der Brustkrebsgene *BRCA1* oder *BRCA2 (FANCD1)*. Diese sind so genannte „high-risk“ Gene, die eine sehr hohe Penetranz aufweisen. Frauen mit einer pathogenen Mutation im *BRCA1* oder *BRCA2-(FANCD1)* Gen zeichnen sich durch ein stark erhöhtes Tumorrisiko für Mamma- (69-74 %) und Ovarialkarzinome (12-46 %) (King et al., 2003) aus. Zudem ist das durchschnittliche Erkrankungsalter deutlich geringer als bei den sporadischen Mammakarzinomen (Nathanson et al., 2001; Antoniou et al., 2003; Diedrich et al., 2006; Klijn, 2010; Tinelli et al., 2010).

Trotz intensiver Forschung sind die Ursachen von etwa der Hälfte der familiären Mammakarzinome ungeklärt. Man geht davon aus, dass der größte Teil durch Mutationen in disponierenden Genen mit mittlerer bis niedriger Penetranz hervorgerufen wird. Hierzu zählen insbesondere Gene, die bei der Entstehung von anderen Tumordispositionssyndromen eine Rolle spielen (Ripperger et al., 2008). Zu diesen Genen gehören auch *FANCI (BRIP1)* und *FANCN (PALB2)* aus der Gruppe der Fanconi Anämie-Gene, welche bei Trägern heterozygoter Mutationen ein erhöhtes Risiko für Mammakarzinome hervorrufen (Rahman et al., 2006; Seal et al., 2006).

Die Kenntnis von ursächlichen Mutationen einer familiären Disposition spielt heute eine so wichtige Rolle, da die Kenntnis über eine genetische Disposition eine Risikostratifizierung ermöglicht macht und individuelle Früherkennungsmaßnahmen ergriffen werden können.

1.2 Tumorentstehung

Krebs ist eine genetische Erkrankung, die durch den Verlust der Kontrolle der Proliferation und des programmierten Zelltodes (Apoptose) gekennzeichnet ist. Dabei kommt es durch Veränderungen in Genen, die in der Kontrolle von Proliferation und Zelltod eine wichtige Rolle spielen, zur Entwicklung einer normalen Zelle in eine maligne Zelle. Diese ersten Schritte der Tumorgenese gehen mit einer Aktivierung von Onkogenen und einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen einher und basieren in der Regel auf Genmutationen. Hierbei kommt es zu einer veränderten Genregulation, zu Über- oder Unterexpression oder zum Funktionsverlust bestimmter Gene. Bei der Regulation von Genen spielen auch epigenetische Modifikationen (siehe Kapitel 1.3) eine Rolle, die zur malignen Entartung führen können (Bertram, 2000).

1.3 Epigenetische Mechanismen der Genregulation

Die Epigenetik befasst sich mit erblichen und somatischen Modifikationen der DNA und DNA-assoziierten Proteinen, die nicht durch Mutationen der DNA-Sequenz selbst verursacht werden. Zu den Mechanismen der Epigenetik werden insbesondere die DNA-Methylierung und kovalente Modifizierungen von Histonproteinen gezählt. Epigenetischen Mechanismen kommt eine bedeutende Rolle in der Aktivierung und Inaktivierung von Genen und darüber hinaus in der Differenzierung von Zellen und Geweben zu (Van der Maarel, 2008).

Die Methylierung der DNA findet an sogenannten CpGs statt. Ein CpG ist eine Cytosin-Base, die direkt von einem Guanosin gefolgt wird, wobei das P für die Phosphodiester-Bindung dieser beiden DNA-Basen steht. Die CpGs sind über das gesamte Genom verteilt, wobei Bereiche erhöhter Dichte vorkommen, welche als CpG-Inseln bezeichnet werden. Diese Inseln liegen zumeist im Einflussbereich von Genen und wirken sich im Rahmen der Regulation der Genexpression aus. Hypermethylierung im Promotorbereich von Genen gehen dabei mit einer Repression dieser Gene und einer verminderten Expression einher (Bird, 2002; Cheung et al., 2009). Dahingegen bewirkt eine Hypomethylierung i. d. R. eine vermehrte Expression des Gens (Bhaumik et al., 2007; Van der Maarel, 2008).

Auch wenn die Mechanismen der Epigenetik erst unzureichend verstanden sind, wurden in den letzten Jahren einige Krankheitsbilder entdeckt, in denen epigenetischen Mechanismen eine wesentliche Rolle zukommt. Bei Erkrankungen mit Imprinting-Störungen und einer Vielzahl von Tumorerkrankungen findet man z. B. veränderte Methylierungsmuster. DNA-Hyper- und Hypomethylierungen spielen somit bei der Tumorgenese neben DNA- und Chromosomenmutationen eine wichtige Rolle (Van der Maarel, 2008).

Eine wichtige Erkenntnis im Rahmen der Forschung zu familiären Krebsyndromen war die Entdeckung von DNA-Hypermethylierung in Genen, die in mutierter Form erblichen Dickdarmkrebs hervorrufen können. Hitchins et al. (2005) konnten zeigen, dass bei einigen Patienten, die keine klassische Keimbahnmutation der Gene *MSH2* und *MLH1* aufwiesen, Hypermethylierungen in den Promotorregionen dieser Gene auftraten. Die Veränderungen gingen mit verminderter Expression des Proteins einher und zeigten eine für den erblichen Dickdarmkrebs charakteristische Klinik. Es konnte zudem gezeigt werden, dass diese Hypermethylierung in verschiedenen Geweben des Körpers (Blut, Mundschleimhaut, Haarfollikelzellen etc.) vorhanden waren und z.T. auch im Rahmen der Keimbahn vererbbar waren (Gazzoli et al., 2002; Suter et al., 2004; Hitchins et al., 2005; Chan et al., 2006; Hitchins and Ward, 2009; Crépin et al., 2012).

Epigenetische Regulation und insbesondere DNA-Methylierung stellen somit, wie oben dargestellt, einen wesentlichen Faktor in der Entstehung von vielen Tumorerkrankungen dar und spielen nachweislich auch bei der Entstehung einiger familiärer Krebs syndrome eine Rolle. Aus diesen Gründen kommt deshalb heute der Epigenetik eine wichtige Bedeutung bei der Erforschung der Ursache von Tumorerkrankungen zu.

1.4 Die Fanconi Anämie-Gene

Die Fanconi Anämie-Gene bilden eine Gruppe von Genen, welche für die Reparatur und Erkennung von DNA-Schäden von Bedeutung sind. Bei der Fanconi Anämie handelt es sich um ein seltenes, autosomal-rezessiv (mit Ausnahme von *FANCB*, welches auf dem X-Chromosom lokalisiert ist) vererbtes, genetisches Syndrom, welches durch angeborene Fehlbildungen, Knochenmarkversagen, Chromosomeninstabilität und eine Disposition für maligne Erkrankungen gekennzeichnet ist. Es sind insgesamt 15 Komplementationsgruppen

bekannt (A, B, C, D1 (BRCA2), D2, E, F, G, I, J (BRIP1), L, M, N (PALB2), O und P, siehe auch Tabelle 1). Das Krankheitsbild kann durch Mutationen in allen Fanconi Anämie-Genen ausgelöst werden (Wang, 2007; Vaz et al., 2010; Kim et al., 2011).

Fanconi Anämie-Patienten weisen durch den defekten FA/BRCA Pathway eine genetische und chromosomale Instabilität auf. Diese Instabilität wird durch das Unvermögen der einzelnen Zelle hervorgerufen, DNA-Schäden ausreichend zu erkennen und zu beheben. Es kommt zur Anreicherung von chromosomalen Aberrationen und zu Veränderungen der Erbinformationen, welche schließlich in malignen Erkrankungen münden können (Moldovan and D'Andrea, 2009).

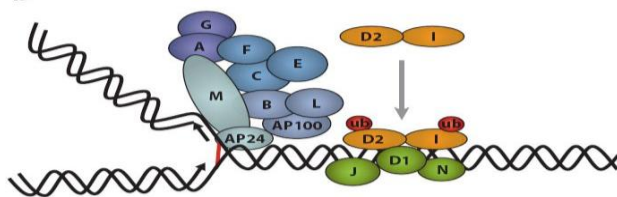


Abbildung 1: Fanconi DNA Reparatur Komplex. Der Core-Komplex (blau) interagiert durch FANCM und FAAP24 mit der DNA-Läsion (Inter strand crosslinks) und führt zur Ubiquitynylierung von FANCD2 und FANCI. Zusammen mit FANCN (PALB2), FANCI (BRIP1) und BRCA2 (FANCD1) lagern sich diese an den Ort der Schädigung an und führen dort zur Initiation der DNA Reparatur (aus: Moldovan and D'Andrea, 2009).

Zu den malignen Erkrankungen, die gehäuft bei der Fanconi Anämie auftreten, gehören vor allem hämatologische Erkrankungen wie die akute myeloische Leukämie oder das myelodysplastische Syndrom, aber auch Kopf-Hals-, Anogenital- und Ösophaguskarzinome (Rosenberg et al., 2008; Auerbach, 2009).

Tabelle 1: Chromosomale Lage der Fanconi Anämie-Gene und des BRCA1-Gens, sowie Prävalenz der Mutationen bei Fanconi Anämie-Patienten (aus: Chen et al., 1996; Moldovan and D'Andrea, 2009)

Fanconi Anämie Gen	Prävalenz	Chromosomale Position	Größe (kDa)
<i>FANCA</i>	66 %	16q24.3	163
<i>FANCB</i>	2 %	Xp22.31	95
<i>FANCC</i>	10 %	9q22.3	63
<i>BRCA2 (FANCD1)</i>	2 %	13q12-13	380
<i>FANCD2</i>	2 %	3q25.3	155, 162
<i>FANCE</i>	2 %	6p21-22	60
<i>FANCF</i>	2 %	11p15	42
<i>FANCG</i>	9 %	9p13	68
<i>FANCI</i>	2 %	15q25-26	140, 147
<i>FANCI (BRIP1)</i>	2 %	17q22-24	140
<i>FANCL</i>	0.2 %	2p16.1	43
<i>FANCM</i>	0.2 %	14q21.3	250
<i>FANCN (PALB2)</i>	2 %	16p12.1	140
<i>BRCA1</i>	-	17q21	220

* ohne *FANCO* und *FANCP* (Erstbeschreibung 2010 und 2011)

1.5 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte das Methylierungsmuster regulatorischer Regionen der Fanconi Anämie-Gene und des *BRCA1*-Gens bei Patientinnen mit familiärem Mammakarzinom untersucht werden. Es sollte die Frage geklärt werden: tritt eine DNA- (Hyper- oder Hypo-) Methylierung in diesen Genen beim familiären Mammakarzinom auf?

Es sollten zunächst PCR- und Pyrosequenzier-Assays für die einzelnen Fanconi Anämie-Gene und das *BRCA1*-Gen auf die Verwendung von FFPE als Untersuchungsmaterial optimiert werden und die Untersuchungen mit den Assays fortgesetzt werden, die nachweislich stabile Ergebnisse liefern. Durch eine Bisulfit-Pyrosequenzierung ausgewählter CpGs regulatorischer Regionen von *BRCA1* sowie der Fanconi Anämie-Genen (*FANCA*, *B*, *C*, *D2*, *E*, *F*, *G*, *I*, *L*, *M*, *N* (*PALB2*), *J* (*BRIP1*), *BRCA2* (*FANCD1*)) sollte an einem Untersuchungskollektiv von 26 Mammakarzinom-Patientinnen (davon 18 *BRCA1/2*- negativ, 5 *BRCA1* positiv und 3 *BRCA2* (*FANCD1*) positiv) mit familiären Hintergrund das Methylierungsmuster dieser Gene analysiert werden. Um eine Vorauswahl der Assays der Gene zu treffen, in denen mit hoher Häufigkeit eine differentielle Methylierung zwischen Normal- und Tumorgewebe zu erwarten war, sollten im Rahmen von Voruntersuchungen acht Mammakarzinomzelllinien untersucht und deren Methylierungsstatus der *BRCA*/Fanconi Anämie-Gene ermittelt werden.

Bei dem untersuchten Kollektiv handelt es sich um Mammakarzinom-Patientinnen, bei denen aufgrund der familiären Häufung von Mamma-/Ovarialkarzinomen der dringende Verdacht einer familiären Disposition besteht oder durch eine Keimbahnmutation sicher vorliegt. Da eine Promoter Hyper- bzw. Hypomethylierung auch bei sporadischen Tumoren sehr häufig im Rahmen der Karzinogenese als somatisches Ereignis im Tumorgewebe auftritt (Hitchins et al., 2005), sollte auch der Methylierungsstatus der DNA des Blutes der Patientinnen untersucht werden, welcher eher die konstitutionelle Methylierung dieser Gene widerspiegelt (Suter et al., 2004; Hitchins et al., 2005; Chan et al., 2006). Es sollte versucht werden zu klären, ob nachgewiesene Veränderungen auf das Tumorgewebe beschränkt sind oder auch im Blut der Mammakarzinom-Patientinnen auftreten. Abschließend sollten die identifizierten differentiellen Methylierungen hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung (Tumorstadium, Grading, Erkrankungsalter, Mutations- und Rezeptorstatus (Östrogen-, Progesteron-, Her2/neu-Rezeptor)) ausgewertet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungskollektiv und Kontrollen

In die Untersuchung wurden 26 Mammakarzinompatientinnen mit familiärer Disposition (siehe Tabelle 2) sowie eine Kontrollgruppe von 8 klinisch gesunden, weiblichen Personen ohne Hinweis auf eine familiäre Disposition für ein Mammakarzinom ausgewählt.

Tabelle 2: Klinische Daten der Mammakarzinom-Patientinnen

Proben	Erkrankungsalter	BRCA Status	Staging	Nodalstatus	Metastasierung	Grading	ÖR	PR	Her2
P1	83	negativ	rpT2	kA	kA	G2	+	+	+
P2	39	negativ	pT1c	pN0	M0	G2	+	+	+
P3	53	negativ	pT2	pN0	kA	G2	+	+	-
P4	51	BRCA1	pT1c	pN1a	M0	G3	+	+	-
P5	55	BRCA2	pT1c	pN0	M0	G3	+	+	+
P6	40	BRCA1	ypT3	ypN1a	M0	Gx	-	-	-
P7	36	negativ	ypT1b	ypN1mi	Mx	kA	+	+	+
P8	53	BRCA1	pT1c	pN0	M0	G2	-	-	-
P9	34	negativ	pT2	pN0	kA	G3	+	+	+
P10	62	BRCA1 SP	ypT3	pN0	M0	G3	+	+	-
P11	59	negativ	ypT2	ypN0	kA	G3	-	-	-
P12	59	negativ	rpT1	kA	kA	G2	+	+	-
P13	25	negativ	pT1b	pN0	M0	G2	+	+	kA
P14	38	BRCA1	pT2	pN0	Mx	G3	+	+	+
P15	72	negativ	pT3	pN0	M0	G2	-	-	-
P16	58	negativ*	pT1c	pN0	M0	G3	-	+	+
P17	34	negativ	ypT1c	pN0	M0	G2	+	+	+
P18	46	negativ	pT1c	pN2a	M0	G3	+	+	kA
P19	47	negativ	pT3	pN3a	M0	G3	+	+	+
P20	62	negativ	pT2	pN2a	M0	G2	+	+	+
P21	58	BRCA2	pT2	pN1mi	M0	G3	+	-	-
P22	44	negativ	pT3	pN0	M0	G2	+	-	+
P23	35	negativ	pT1c	pN0	M0	G2	+	+	-
P24	60	negativ	pT1c	pN0	pMx	G2	+	+	-
P25	65	negativ	pT1c	pN1	M0	G2	+	+	+
P26	33	BRCA2	pT2	pN1	kA	G1	+	+	-

kA = keine Angabe; ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor.

Das untersuchte Patientenkollektiv setzt sich zusammen aus 18 Patientinnen ohne Mutation in den bekannten Brustkrebsgenen *BRCA1* und *BRCA2* (*FANCD1*), fünf Patientinnen mit *BRCA1*-Mutation sowie drei Patientinnen mit *BRCA2* (*FANCD1*)-Mutation. Die Patientinnen stammen aus Familien, in denen nach den Kriterien des Deutschen Konsortiums für Erbliehen Brust- und Eierstockkrebs (siehe Tabelle 3) eine Häufung von Mamma-/Ovarialkarzinomen bestand und/oder diese Tumoren in besonders jungem Alter aufgetreten sind und die sich

deshalb zur Beratung in der Tumorrisiko-Sprechstunde des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, vorgestellt haben.

Tabelle 3: Einschlusskriterien des Deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs für einen BRCA-Gentest (aus: <http://www.awmf-leitlinien.de/>, 1. Aktualisierung 2008; Zugriff: 13.5.2010)

Unter Verwandten einer (väterlichen oder mütterlichen) Familie liegt eine der folgenden Konstellationen vor:

- drei Frauen mit Brustkrebs, unabhängig vom Alter
- zwei Frauen mit Brustkrebs, davon eine Erkrankung vor dem 51. Lebensjahr
- eine Frau mit Brustkrebs und eine Frau mit Eierstockkrebs
- zwei Frauen mit Eierstockkrebs
- eine Frau mit Brust- und eine Frau mit Eierstockkrebs
- eine Frau und ein Mann mit Brustkrebs
- eine Frau mit Eierstockkrebs und ein Mann mit Brustkrebs
- eine Frau mit Brustkrebs vor dem 36. Geburtstag
- eine Frau mit bilateralem Brustkrebs, wobei die Ersterkrankung vor dem 51. Geburtstag war
- eine Frau mit Brust- und Eierstockkrebs

Das zur Verfügung stehende Material bestand aus Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE) Mammakarzinom-Gewebe mit einer Lagerungsdauer von bis zu zehn Jahren und stammte aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr. Christoph Röcken). Zudem stand DNA aus peripherem Blut von 24 der 26 Mammakarzinompatientinnen zur Verfügung, die freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Norbert Arnold an der Universitäts-Frauenklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Walter Jonat) zur Verfügung gestellt wurde. Das Erkrankungsalter der Patientinnen lag zwischen 25 und 83 Jahren (MW = 50 Jahre). Es lagen jeweils schriftliche Einverständniserklärungen der untersuchten Personen vor. Das Forschungsprojekt wurde durch die Voten (Nr. 401/05 und 447/09) der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (siehe Anhang).

Des Weiteren wurden acht Mammakarzinomzelllinien untersucht (siehe Tabelle 4 auf der folgenden Seite). Drei der Zelllinien (HCC 1599, HCC 1937 und BT-474) wurden in Form von extrahierter DNA vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die anderen fünf Mammakarzinomzelllinien wurden freundlicherweise als Zellkultur vom Onkologischen Labor der Universitäts-Frauenklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Walter Jonat) zur

3 | Material und Methoden

Verfügung gestellt und zum Ausschluss einer Kontamination der Zellkulturen STR-Analysen durchgeführt.

Als Kontrollmaterial zur Bestimmung der DNA-Methylierung im Tumorgewebe und den Mammakarzinomzelllinien wurde gesundes Brustdrüsengewebe verwendet. Dieses lag in kryokonservierter Form (-80°C) vor. Sieben Kontrollen stammten von Mamma-Reduktionsoperationen ohne onkologischen Hintergrund, die aus kosmetischen oder orthopädischen Gründen durchgeführt wurden. Eine Kontrolle (KBR-1) stammte von einer Mammakarzinompatientin, bei der die Gewebeentnahme im Rahmen einer Anpassungsplastik der kontralateralen Mamma gewonnen wurde und bei der histopathologischen Untersuchung keinen Hinweis auf Malignität zeigte. Die Kontrollen wurden freundlicherweise von Dr. med. Özkan Alkasi, Universitäts-Frauenklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Walter Jonat) zur Verfügung gestellt. Die Kontrollgruppe setzte sich aus Frauen im Alter von 22 bis 56 Jahren (MW = 35,9 Jahre) zusammen.

Tabelle 4: Mammakarzinomzelllinien

Zelllinie	Isolation	Erkrankungsalter	Ethnie	BRCA1/2 Status*	ÖR	PR	Her2	Referenz
BT 474	1978	60	Kaukasisch	negativ	-	-	+	(Tong et al., 1999; Moulder et al., 2001)
HCC 1599	1995	44	Kaukasisch	homozygot BRCA2**	-	-	-	(Gazdar et al., 1998)
HCC 1937	1995	24	Kaukasisch	5382insC BRCA1	-	-	-	(Gazdar et al., 1998)
MBA MB 231	1973	51	Kaukasisch	negativ	-	-	-	(Cailleau et al., 1978; Lewis et al., 1993; Tong et al., 1999)
MDA MB 468	1977	51	Afroamerikanisch	negativ	-	k. A.	-	(Cailleau et al., 1978; Thompson et al., 1992; Konecny et al., 2006)
SK BR 3	1976	43	Kaukasisch	negativ	-	-	+	(Trempe, 1976; Tong et al., 1999)
T47 D	1979	54	Kaukasisch	negativ	+	+	-	(Keydar et al., 1979; Konecny et al., 2006)
ZR-75-1	1978	63	Kaukasisch	negativ	+	-	-	(Engel et al., 1978; Konecny et al., 2006)

Isolation = Jahr der Isolation der Zelllinien; ÖR = Östrogenrezeptor-status; PR = Progesteronrezeptorstatus;

Her2 = Her2/neu Rezeptorstatus; + = positiv; - = negativ; k.A. = keine Angaben; * (Elstrodt et al., 2006; Cancer Cell Line Project, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/CellLines/>; Zugriff: 15. Januar 2010); **somatische Variante

Um den Methylierungsstatus der DNA aus peripherem Blut zu untersuchen, wurde DNA aus dem Blut von zehn gesunden weiblichen Probandinnen im Alter von 9 bis 42 Jahren (MW = 25,5 Jahre) und zusätzlich für den Methylierungsstatus des *FANCB*-Gens von zehn gesunden

männlichen Probanden im Alter von 20 bis 66 Jahren (Mittelwert = 41,8 Jahre) isoliert und die DNA-Methylierung bestimmt. Die beiden Gruppen wurden als Kontrollgruppen bei der Analyse der DNA-Methylierung des peripheren Blutes der Mammakarzinom-Patientinnen verwendet.

2.1.2 Technische Kontrollen für die Bisulfit-Pyrosequenzierung

Zur Kontrolle eines jeden Durchlaufs der Bisulfit-Pyrosequenzierung wurde eine vollständig methylierte DNA der Fa. Millipore (Schwalbach, Deutschland) und eine gepoolte Kontroll-DNA isoliert aus peripheren Blutproben von je zehn gesunden männlichen und weiblichen Probanden im Alter von 9 bis 69 Jahren mitgeführt.

2.1.3 Reagenzien und Kits

Name	Hersteller
10x PCR Puffer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
10x TBE Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
5x Discoverase PCR Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
AmpliTagGold 1000	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Desoxynukleosid Triphosphat Mix 2mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Desoxynukleosid Triphosphat Set	Roche, Mannheim, Deutschland
Discoverase dHPLC DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Ethanol absolut	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Genomic DNA Isolation Kit von Gentra Systems	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
HCL	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KCl	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ 25mM	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄ 50mM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaSCN	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat-Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Optical Tape	BioRad, München, Deutschland
CpGenome Universell Methylierte DNA	Millipore, Schwalbach, Deutschland
PCR Platte	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1 10mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PSQ 96 Reagent Cartridge	Biotage, Düsseldorf, Deutschland
PSQ 96 Sample Prep Thermoplate Low	Biotage, Uppsala, Schweden
Pyro Gold SOA Reagents 96	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark Binding Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PyroMark PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin Sepharose Beads	GE Healthcare Europe, München, Deutschland

3 | Material und Methoden

Titriplex III (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TriDye 100bp DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.,
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

2.1.4 Geräte

Name	Gerätetyp	Hersteller
Megafuge 1.0 R	Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Biofuge primo R	Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Centrifuge MC6	Zentrifuge	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikro 200 Microcentrifuge	Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Reax 2000	Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Vortex Genie 2	Vortexer	Bender & Hobein GmbH, Bruschsals, Deutschland
LC 621P	Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Polymax 1040	Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
MS3 basic	Schüttler	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen,
Thermomixer Compact	Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop ND-1000	Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen,
NanoDrop 1000 3.7.1.	Software	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen,
BioDocAnalyse 2.1.	Software	Biometra, Göttingen, Deutschland
Pyro Q-CPG 1.0.9.	Software	Biotage GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Pyrosequencing Assay Design	Software	Biotage GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Gel Elektrophorese Kammer	Agarosegel-Kammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen,
Electrophorese Powerpack P24	Elektrophorese-	Biometra, Göttingen, Deutschland
M500	Mikrowelle	Philipps, Hamburg, Deutschland
BioDocAnalyse Ti5	UV-	Biometra, Göttingen, Deutschland
SW-21C	Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Function Line B6	Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
RC10.10	Vacuum	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Deutschland
T3000 Thermocycler	Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
DNA Engine	Thermocycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München,
MJ Research PTC-200	Thermocycler	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf,
Hybridisation oven	Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen, Deutschland
PyroMark ID	Pyrosequenzierer	Biotage GmbH, Uppsala, Schweden
PyroMark Vacuum Prep	Pyrosequenzierer	Biotage GmbH, Uppsala, Schweden
Vakuumpumpe	Laborpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg i. Breisgau,
Hotplate	Heizplatte	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
3130 Genetic Analyzer	Sanger-Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Puffer und Lösungen

Name	Ansatz
Gel-Loading-Puffer	Bromphenolblau Na-Salz 0,125 g
	Glycerin 28,7 g
	→ ad 100 ml mit dest. H ₂ O auffüllen
Desoxynukleosidtriphosphate 5 nmol/µl (5 mM)	Je dNTP (100 mM) 100 µl
	dest. H ₂ O 1600 µl
	→ in ca. 200 µl Portionen aliquotieren
0,5 M EDTA Lösung	Titriplex III 186,1 g
	Dest. H ₂ O 800 ml
	Natriumhydroxid Plättchen 20g
	→ pH auf 8,0 einstellen
	→ ad 1000 ml mit dest. H ₂ O auffüllen

3 | Material und Methoden

1x TBE Puffer	→ 10xTBE Puffer (Invitrogen) 1:10 mit dest. H ₂ O verdünnen	
3M NaAc pH 5,0	Natriumacetat-Trihydrat CH ₃ COONa x 3 H ₂ O	40,82g
	in dest. H ₂ O lösen	80 ml
	→ mit Natronlauge pH auf 5,0 einstellen	
	→ ad 100 ml mit dest. H ₂ O auffüllen.	
Natriumthiocyanat 1M	NaSCN	4,86 g
	→ ad 60 ml mit dest. H ₂ O auffüllen	
DNA-Isolierungspuffer	1M NaCl	75 ml
	Tween 20	5 ml
	0,5M EDTA	50 ml
	→ ad 1000 ml mit dest. H ₂ O auffüllen	
Ethanol 70 %	Ethanol absolut	140ml
	→ ad 200 ml mit dest. H ₂ O auffüllen	
1x PBS	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,44 g
	KH ₂ PO ₄	0,24 g
	in dest. H ₂ O lösen	800 ml
	→ pH auf 7,4 einstellen mit 1M HCl	
Denaturierungslösung 0,2 M für Pyrosequenzierung	NaOH	8 g
	→ ad 1000 ml mit dest. H ₂ O auffüllen	
Waschpuffer für Pyrosequenzierung	Tris	6.5 g
	→ ad 5000 ml mit dest. H ₂ O auffüllen	
2 % Agarose-Gel	1x TBE Puffer	100 ml
	Agarose	2 g
	Ethidiumbromid	5 ul
2.1.5.1	Bei der Herstellung des Gels wurde die Agarose in einem Erlenmeyerkolben in 1x TBE Puffer gelöst und in der Mikrowelle zum kochen gebracht. Der Erlenmeyerkolben wurde unter kaltem Wasser auf Handwärme abgekühlt, das Ethidiumbromid dazugegeben und durch schwenken vermischt. Das Gel wurde unter Vermeidung von Blasenbildung in eine Gelkammer gegossen und kühlte ca. 20 min zum Erstarren an der Luft ab.	

2.1.6 Primer für die Kontrollgen-PCR

Die Primersequenzen für die Kontrollgen-PCR wurden der Literatur (Van Dongen et al., 2003) entnommen und von Biomers.net (Ulm, Deutschland) bezogen.

2.1.7 Primerdesign und Primersequenzen

Die Assays wurden mit der Pyrosequencing Assay Design Software von Biotage (Biotage GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) von Dr. rer. nat. J. Richter am Institut für Humangenetik in Kiel erstellt und die Primer von Biomers.net (Ulm, Deutschland) bezogen.

Tabelle 5: Primer für die Fanconi Anämie-Gene und das *BRCA1*-Gen

Gen	Name	Sequenz	Fragmentgröße PCR Produkt
<i>FANCA</i>	FANCA_FP	Biotin-5'-TTAGGTTGGTTAAAAGATAGGGT-3'	102 bp
	FANCA_RP	5'-TCCCAACCTCAAATAATCC-3'	
	FANCA_Seq	5'-CCAACCTCAAATAAT-3'	
<i>FANCB</i>	FANCB_FP	5'-AGAGGTAGATAGAGAAGGGTG-3'	134 bp
	FANCB_RP	Biotin-5'-AAACCTAAACTAAAAACCTAATC-3'	
	FANCB_Seq	5'-GGGTGGGAGGGGGAG-3'	
<i>FANCC</i>	FANCC_FP	5'-AGGAGGAGAGGGGTAAGA-3'	103 bp
	FANCC_RP	Biotin-5'-ACCTTAACCACAACCCTA-3'	
	FANCC_Seq	5'-GGGTAAGAGGGAAGG-3'	
<i>FANCD2</i>	FANCD2_FP	5'-ATTTGTTTTTGGGTGAGTT-3'	124 bp
	FANCD2_RP	Biotin-5'-ATTACTTAACCTCAACATCTACC-3'	
	FANCD2_Seq	5'-TTTTTGTAGTTTTTTAGTA-3'	
<i>FANCE</i>	FANCE_FP	5'-GTAGAGGAGAGTTTGTAATAG-3'	109 bp
	FANCE_RP	Biotin-5'-CTAATATAAAACCTCAACTCAAA-3'	
	FANCE_Seq	5'-AGGAGAGTTTGTAAATAGG-3'	
<i>FANCF</i>	FANCF_FP	Biotin-5'-GTTAGTTATTATTTGGTGTAGTAAT-3'	146 bp
	FANCF_RP	5'-AAATTCTCTCTATAACCATTA-3'	
	FANCF_Seq1	5'-AAACCCAACATATACAC-3'	
<i>FANCG</i>	FANCG_FP	5'-GGGAATTTAGTAGGATTT-3'	166 bp
	FANCG_RP	Biotin-5'-CCCAAATCCTATCTAACTAAA-3'	
	FANCG_Seq	5'-TTTTAGAGGTTGTGGTT-3'	
	FANCG_Seq2	5'-TTTAGAGGTTGTGGTT-3'	
<i>FANCI</i>	FANCI_FP	5'-TTTAGATTGTGAGTTGGGA-3'	197 bp
	FANCI_RP	Biotin-5'-ATCACCTCCACCTCACCT-3'	
	FANCI_Seq	5'-TTTAGTTTTTATGGTATA-3'	
<i>FANCL</i>	FANCL_FP	Biotin-5'-TTTTAGTTAAGGTTGGGGTTT-3'	201 bp
	FANCL_RP	5'-ACCCAAATAAATCCCTCATAC-3'	
	FANCL_Seq	5'-GACTAAATCCTACACATAC-3'	
<i>FANCM</i>	FANCM_FP	5'-TAAGGAGTTTTTGTAGTAGTAG-3'	153 bp
	FANCM_RP	Biotin-5'-CAATTAATAAAATAAATCCACAA-3'	
	FANCM_Seq	5'-GGAGGTTTAGTTGGAG-3'	
<i>FANCI</i> (<i>BRIP1</i>)	BRIP1_FP	Biotin-5'GAGTTAGTTGGGTTATTGG-3'	137 bp
	BRIP1_RP	5'-ACTTCCCCCACCTTATAT-3'	
	BRIP1_Seq	5'-ACCCCTCAACCACAC-3'	
<i>FANCN</i> (<i>PALB2</i>)	PALB2_FP	5'-GTTTTAGGTGGTTTATTGG-3'	120 bp
	PALB2_RP	Biotin-5'-CCCACCAATTAATCCAC-3'	
	PALB2_Seq	5'-AGGAGGTTTAGTTTTATTGT-3'	
<i>BRCA1</i>	BRCA1_FP	Biotin-5'-TGGTTTAGGTTAGTTAGAG-3'	164 bp
	BRCA1_RP	5'-AAAATTAATAAATCTATAATTCA-3'	
	BRCA1_seq	5'-ATCTATAATTCAAAATAC-3'	
<i>FANCD1</i> (<i>BRCA2</i>)	BRCA2_FP	Biotin-5'-TTATTAGGGAGGTTGAGGTAGGAGAAT TATTTGATTTTTG-3'	220 bp
	BRCA2_RP	5'CAACCCCTTTCCTTACATAAAAAATTATAAAAC CCATCTT-3'	
	BRCA2_Seq	5'-AAATTATAAAACCCATC-3'	

Tabelle 6: Zielregionen der Analyse der DNA-Methylierung der Fanconi Anämie-Gene und des *BRCA1*-Gens (Daten aus: Szaumkessel et al., 2011)

Gen	Amplikon Lokalisierung	Anzahl CpGs (n=)	Amplikon Position (UCSC Genome Browser, 2009) \diamond	CpGs location (bp des Amplikon, von 5' Ende des Plus-Strangs)
<i>BRCA1</i>	Promoter	9	chr17:41278672-41278831	7, 35, 43, 66, 79, 99, 105, 109, 124
<i>BRCA2</i>	Promoter	2	chr13:32888876-	148, 176

(<i>FANCD1</i>)			32889096	
<i>FANCJ (BRIP1)</i>	Promoter	6	chr17:59940795-59940931	21, 31, 39, 46, 54, 59
<i>FANCA</i>	Promoter	6	chr16:89883819-89883920	36, 46, 74, 79, 83, 99
<i>FANCB</i>	Promoter	11	chrX:14891429-14891562	33, 37, 46, 53, 63, 66, 69, 74, 90, 94, 106
<i>FANCC</i>	Intron	10	chr9:98079622-98079724	28, 30, 36, 49, 51, 58, 65, 78, 81, 83
<i>FANCD2</i>	Promoter	5	chr3:10067734-10067857	26, 47, 55, 68, 81
<i>FANCE</i>	5' UTR/Exon	8	chr6:35420182-35420290	23, 37, 43, 46, 48, 57, 60, 73
<i>FANCF</i>	CDS/Exon 1	10	chr11:22646893-22647038	33, 38, 42, 46, 51, 54, 85, 94, 97, 100
<i>FANCG</i>	5' UTR/Exon	9	chr9:35079856-35080021	105,107,104,108,113,121,125,129,148
<i>FANCI</i>	Promoter	10	chr15:89787084-89787280	67, 71,82,86, 89, 100, 108, 123, 130, 141
<i>FANCL</i>	Promoter/5' UTR/CDS	8	chr2:58468358-58468558	99, 106, 116, 112, 118, 129, 140, 170
<i>FANCM</i>	Promoter/5' UTR/CDS	7	chr14:45605348-45605500	42, 46, 64, 66, 69, 73, 83
<i>FANCN (PALB2)</i>	Promoter	7	chr16:23652649-23652768	68, 72, 78, 84, 86, 97, 118

Tabelle 7: Primer für die Sanger-Sequenzierung des *BRCA2*-(*FANCD1*) Gens

Gen	Name	Sequenz	Fragmentgröße PCR Produkt
<i>BRCA2</i> - <i>Sanger</i>	BRCA2_FP	5'-TGACCAACAACGGAGAAACC -3'	327 bp
	BRCA2_RP	5'-TTGGGTAGCAGGTGTTCAAGA -3'	

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung des Tumorzellgehalts der Paraffinschnitte (FFPE)

Der Methylierungsgrad der DNA ist abhängig vom Gewebetyp und variiert zum Teil erheblich zwischen den einzelnen Gewebetypen. In den Tumorböcken, in denen das Untersuchungsmaterial konserviert wurde, fand sich neben den Tumorzellen auch umliegendes Drüsen-, Fett- und Bindegewebe. Bei der DNA-Extraktion aus Tumorböck-schnittpräparaten wird auch die DNA der Zellen des Umgebungsgewebes isoliert und könnte bei der Methylierungsanalyse das Ergebnis eventuell verfälschen. Um den Grad des Einflusses der umgebenden Gewebe abschätzen zu können, wurde in den Schnitten des Tumorgewebes der Tumorzellgehalt von Frau Dr. Mathiak (Institut für Pathologie des Uni-versitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr. Christoph Röcken)) anhand histologischer Schnittpräparate unter dem Mikroskop prozentual abgeschätzt (Anteil des Tumors zur Gesamtfläche des Gewebes).

2.2.2 Anreicherung des Tumorzellgehalts

In einzelnen Proben wurde der Tumorzellgehalt manuell angereichert. Dazu wurde das den Tumor umgebende Gewebe mit einem Skalpell entfernt und nur das Tumorgewebe für die weitere Untersuchung eingesetzt. Die manuelle Anreicherung wurde freundlicherweise von Frau Sigrid Hamann (Onkologisches Labor der Universitäts-Frauenklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Walter Jonat)) durchgeführt.

2.2.3 DNA-Extraktion aus FFPE-Tumorgewebe

Für die DNA-Extraktion aus FFPE standen als Ausgangsmaterial je Tumorbloc zeh n Schnitte à 8 µm zur Verfügung. Um das Paraffin vom Gewebe zu lösen, wurden die Schnitte dreimal mit Roti-Histol gewaschen und bei 13.000 U/m (16467.36 g) für 5 Minuten zentrifugiert. Das Roti-Histol wurde anschließend durch zweimaliges waschen mit Ethanol abs. entfernt. Das Material wurde im Vacuum Concentrator getrocknet und das Pellet über Nacht in 1 ml 1 M NaSCN inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe dreimal mit DNA-Isolierungspuffer gewaschen und danach in 1 ml DNA-Isolierungspuffer und 80 µl Proteinase K für ca. 72 std. bei 55° C im Wasserbad inkubiert. Nach 24 std. und 48 std. wurde jeweils 80 µl Proteinase K hinzugegeben. Nach dem Verdau wurden die Ansätze gesplittet und das Gewebe zweimal 30 min mit 800 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) gewaschen und bei 10.000 U/min (9744 g) für 10 min zentrifugiert. Nach dem 1. Phenol-Chloroform-Extraktionsschritt wurde die wässrige Phase in ein neues Tube überführt und anschließend erneut mit Phenol-Chloroform gewaschen. Mit Hilfe von eisgekühltem Ethanol abs. und 25 µl 3M Natriumacetat wurde für 30 min bei -80° C die DNA präzipiert. Durch Zentrifugation (15 min bei 13.000 U/min (16467.36 g)) bei 4 °C konnte die DNA als Pellet gewonnen werden. Die DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA in der SpeedVac getrocknet, in RNase-freiem Wasser bei 4° C über Nacht gelöst und bei -20° C gelagert.

2.2.4 DNA-Extraktion aus kultivierten Zellen und kryokonserviertem Gewebe

Die DNA aus den kultivierten Mammakarzinomzelllinien wurde gemäß Protokoll des DNA-Extraktions Kit der Fa. Gentra isoliert. Die Extraktion der DNA aus dem Gewebe der Kontrollgruppe aus gesundem, kryokonserviertem Brustdrüsengewebe wurde gemäß Protokoll des Genomic DNA Isolation Kit von Gentra Systems (Gentra® Puregene® Handbook, Qiagen GmbH) durchgeführt. Dabei wurde jeweils ca. 200 mg Brustdrüsengewebe als Ausgangsmaterial eingesetzt.

2.2.5 DNA-Quantifizierung, -Reinheit und Kontrollgen-PCR

Die DNA-Konzentration und die Reinheit der DNA wurden spektralphotometrisch mit dem NanoDrop ND-1000 gemessen. Um den Degradationsgrad der DNA des FFPE-Materials zu bestimmen, wurde eine Kontrollgen-PCR durchgeführt (Van Dongen et al., 2003). Hierbei werden Kontrollgene verschiedener Länge (100, 200, 300, 400 und 600bp) mittels PCR vervielfältigt und somit die Amplifizierbarkeit bzw. Güte der untersuchten DNA bestimmt. Bei DNA die hochfragmentiert ist können nur kurze bzw. keine PCR-Produkte amplifiziert werden und molekularmedizinische Untersuchungen sind an diesem Material nur begrenzt durchführbar.

2.2.6 Gelelektrophorese genomischer DNA

Der Grad der Fragmentierung der aus FFPE isolierten DNA wurde zusätzlich anhand einer Gelelektrophorese der DNA kontrolliert. Dazu wurden 500 ng DNA und 3,5 µl Gel-Ladepuffer auf ein zweiprozentiges Agarosegel aufgetragen, die DNA bei 100 V ca. 60 min aufgetrennt. Die Fragmentgröße der PCR-Produkte wurde anhand der TriDye100bp DNA-Basenleiter kontrolliert.

2.2.7 Natriumbisulfitkonversion

Für die Bisulfit-Pyrosequenzierung wird natriumbisulfitkonvertierte DNA als Untersuchungsmaterial benötigt. Die Natriumbisulfitkonversion der DNA-Proben wurde nach dem Standardprotokoll für qualitativ hochwertige, wenig degradierte, DNA (Blutproben, Kontrollen und Zelllinien) bzw. DNA mit degradierter Qualität (FFPE-Proben) des EpiTect Bisulfite Kits (Qiagen GmbH) durchgeführt.

2.2.8 PCR der natriumbisulfitkonvertierten DNA

Tabelle 8: Reaktionsansätze für die Fanconi- und *BRCA1* PCR-Assays (PyroMark PCR Kit)

Assay	PM	PyroMark 2x Buffer (µl)	Coral -Load 10x	Primer F (µl)	Primer R (µl)	MgCl ₂ 25 mM (µl)	Betaine (µl)	dH ₂ O (µl)	Q- Solution (µl)
<i>FANCA</i>	55	12,5	2,5	0,5	0,5	0,5		7,5	
<i>FANCB</i>	58	12,5	2,5	0,5	0,5			8	
<i>FANCC</i>	55	12,5	2,5	0,5	0,5			8	
<i>FANCD2</i>	55	12,5	2,5	0,5	0,5			8	
<i>FANCE</i>	60	12,5	2,5	0,5	0,5			8	
<i>FANCF</i>	55	12,5	2,5	0,5	0,5	0,5	0,5	7	
<i>FANCG</i>	55	12,5	2,5	0,5	0,5			8	
<i>FANCI</i>	55	12,5	2,5	0,5	0,5			3	5
<i>FANCL</i>	55	12,5	2,5	0,5	0,5			8	
<i>FANCM</i>	58	12,5	2,5	0,5	0,5	0,5		7,5	
<i>FANCI</i>	55	12,5	2,5	0,5	0,5			8	

3 | Material und Methoden

<i>FANCN</i>	55	12,5	2,5	0,5	0,5			8	
<i>BRCA1</i>	55	12,5	2,5	0,5	0,5	1,5	0,5	6	
<i>BRCA2</i>	60	12,5	2,5	0,5	0,5	0,5		7,5	
→ 24 µl des Mastermixes zu je 1 µl vorgelegter natriumbisulfitkonvertierter DNA → je PCR Ansatz eine Negativkontrolle (Wasser) mitführen → Programm: PM55/58/60									

PM = Thermocyclerprogramm; Primer F = Forward Primer; Primer R = Reverse Primer; MgCl₂ = Magnesiumchlorid

Tabelle 9: PyroMark Thermocycler Protokolle für die Fanconi- und *BRCA1* PCR-Assays

Programm:	PM55	PM58	PM60
Denaturierung	95° C 15 min	95° C 15 min	95° C 15 min
Denaturierung	94° C 30 sek.	94° C 30 sek.	94° C 30 sek.
Annealing	55° C 30 sek. x45 Zyklen	58° C 30 sek. x45 Zyklen	60° C 30 sek. x45 Zyklen
Elongation	72° C 30 sek.	72° C 30 sek.	72° C 30 sek.
Elongation	72° C 10 min	72° C 10 min	72° C 10 min
Pause (∞)	4° C	4° C	4° C

Die PCR-Ansätze für die FA-Bisulfit-Pyrosequenzierungen wurden nach Optimierung der Assays (siehe auch Kapitel 3.3) anhand der in Tabelle 8 beschriebenen Reaktionsansätze, mit den in Tabelle 9 beschriebenen Thermocyclerprotokollen angesetzt. Für alle PCR-Ansätze wurde das PyroMark PCR Kit (Qiagen GmbH) verwendet.

5 µl des PCR-Produktes wurden auf ein zweiprozentiges Agarosegel aufgetragen und dieses bei 120 V ca. 60 min der Größe nach aufgetrennt. Um die Größe der PCR-Produkte zu beurteilen, wurde die TriDye 100bp DNA-Basenleiter mitgeführt.

2.2.9 Bisulfit-Pyrosequenzierung

Die Bisulfit-Pyrosequenzierung ist eine real-time Sequenziertechnik. Dabei dient ein einzelsträngiges PCR-Produkt als Matrize für die Synthese des gegenläufigen Stranges und ein Primer legt den Startpunkt der Polymerase-I fest. Voraussetzung für die Bisulfit-Pyrosequenzierung ist die Kenntnis der zu analysierenden Sequenz. Die Einspritzung der komplementären Basen erfolgt (mit Ausnahme der CpGs und Kontrollpositionen) analog der bekannten Basensequenz und die Menge an eingebauten Nukleotiden ist proportional der Freisetzung von Pyrophosphat, das über eine Lichtreaktion gemessen wird (Tost and Gut, 2007).

Um den Methylierungsgrad der DNA zu bestimmen, benötigt die Methode natriumbisulfitkonvertierte DNA. Bei der Konversion wird Cytosin zu Thymin umgewandelt, während methyliertes Cytosin keine Konversion erfährt. Der Methylierungsgrad der CpGs kann anhand des Verhältnisses von Cytosin zu Thymin an der Cytosin (methyliert)/Thymin

(unmethyliert) Position der CpG-Sites der Natriumbisulfitkonvertierten DNA bestimmt werden. An den Positionen der Sequenz, an denen sich CpGs befinden, werden nacheinander die beiden möglichen Nukleotide eingespritzt und anhand des Verhältnisses C/T errechnet die Software (Pyro Q-CpG) den Grad der Methylierung. Als Matrize benötigt die Bisulfit-Pyrosequenzierung dabei einzelsträngige DNA, die mittels eines biotinylierten Primers und eines vakuumbasierten Auftrennungsverfahren gewonnen wird.

Die Bisulfit-Pyrosequenzierung der einzelsträngigen PCR-Produkte der Natriumbisulfitkonvertierten DNA erfolgte mit dem Pyromark Q96 ID Pyrosequenzierer der Firma Biotage.

2.2.9.1 Durchführung der Bisulfit-Pyrosequenzierung

20 µl des PCR-Produktes werden in eine 96-Well PCR-Platte überführt. Zu den PCR-Produkten werden je Well 20 µl dest. H₂O, 5 µl Sepharose Beads und 40 µl Binding Buffer gegeben. Die Platte wird anschließend mit Parafilm (Klebefolie) abgedichtet und für mind. 10 min auf einen Schüttler inkubiert (Sepharose bindet an Biotin). Parallel werden 40 µl Annealing Buffer und 0,5 µl des assayspezifischen Sequenzierprimer je Well auf der Sequenzierplatte vorgelegt und die Sequenzierplatte auf der Vacuum Prep Workstation platziert. Die PCR Platte wird ebenfalls auf die Workstation gestellt. Die Pumpe und das Vakuum am Prep Tool werden angestellt und das Prep Tool zum Waschen in die Wanne mit dest. H₂O gestellt. Nachdem das Wasser aus der Wanne durch die Filter des Tools gesaugt wurde, wird das Prep Tool zum Trocknen in einer halbkreisförmigen Bewegung mehrmals in der Luft geschwenkt. Nun wird das Tool vorsichtig auf die PCR Platte abgesenkt und PCR-Produkte binden, vermittelt durch die Sepharose Beads, an den Filtern des Tools. Es erfolgen nacheinander Wasch- und Denaturierungsschritte (70 % Ethanol, NaOH, Waschpuffer), bei denen die PCR-Produkte aufgereinigt, denaturiert und erneut gewaschen werden. Am Ende liegen die einzelsträngigen PCR-Produkte mittels der Sepharose Beads gebunden an den Filtern des Prep Tools vor. Zwischen den einzelnen Waschsritten wird das Tool jeweils zum Trocknen mehrmals geschwenkt. Als letzter Schritt auf der Workstation wird das Tool dicht über die Sequenzierplatte abgesenkt, das Vakuum abgestellt und das Tool komplett abgesetzt. Durch leichtes Rütteln werden die einzelsträngigen PCR-Produkte von den Filtern des Tools gelöst und liegen danach zusammen mit Annealing Puffer und Sequenzierungsprimer auf der Sequenzierplatte vor. Auf der Heizplatte erfolgt bei 85° C für 2 min eine weitere Denaturierung. Anschließend wird die Sequenzierplatte auf dem Arbeitsplatz

abgekühlt (es kommt zur spezifischen Bindung der Sequenzierprimer). Die Sequenzierplatte wird in der Vorrichtung des Pyromark Q96 ID platziert. Als letzter Schritt wird die Kartusche mit den Pyro Gold SQA Reagenzien befüllt, ebenfalls in die zugehörige Vorrichtung eingesetzt und ein Untersuchungsdurchlauf gestartet.

2.2.9.2 Auswertung

Die Auswertung der Pyrogramme erfolgte manuell und anhand der Kriterien der Software Pyro-Q-CpG. Die Software gibt anhand der Analyse des Pyrogramms „General Warnings“ aus, die eine Beurteilung der Qualität der einzelnen Pyrogramme darstellen. Proben mit einer guten Qualität zeigten keine „General Warnings“ und konnten i. Allg. problemlos ausgewertet werden. Ein Ausschlusskriterium für die Auswertbarkeit der Pyrogramme waren unspezifische Peaks, welche auch durch die Software detektiert wurden. Proben mit einem niedrigen Signal konnten nicht ausgewertet werden. Als zu niedriges Signal wurde ein Einzelpeak mit einer Höhe von weniger als 15 relativen Einheiten definiert. Zudem wurden Proben, bei denen die Methylierungsfrequenz einzelner CpGs stark abwich, wiederholt. Proben, die öfter als zweimal wiederholt werden mussten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

2.2.10 Sanger-Sequenzierung

Die Kettenabbruch-Sequenzierung nach Frederick Sanger ist ein Standardverfahren zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten einer Länge von bis zu 1000 bp (Sanger et al., 1977; Pettersson et al., 2009).

2.2.11 PCR des BRCA2-(FANCD1) Gens für die Sanger-Sequenzierung

Tabelle 10: PCR Reaktionsansatz und Thermocycler-Protokoll für die PCR des BRCA2-(FANCD1) Gens

Reaktionsansatz		Thermocycler-Protokoll	
Dest. H ₂ O	21,5 µl	Lid	94° C
5x Discoverase PCR Puffer	10 µl	Denaturierung	94° C 3 min
MgSO ₄ 50mM	1 µl	Denaturierung Annealing Elongation	94° C 30 sek
dNukleotide (Fermentas)	2,5 µl		60° C 1 min
Primer FW	2 µl		68° C 1 min
Primer RW	2 µl	Elongation	68° C 10 min
Discoverase dHPLC DNA Polymerase	1 µl	Pause (∞)	4° C
→ Gesamt	40 µl		
→ 40 µl des Mastermixes zu je 10 µl vorgelegter DNA (etwa 20ng/µl) geben			

3 | Material und Methoden

Die PCR für die Sanger-Sequenzierung des *BRCA2-(FANCD1)* Gens wurde anhand des Reaktionsansatzes in Tabelle 10 und dem zugehörigen Thermocycler-Protokoll durchgeführt.

3 Ergebnisse

Das Ziel der Arbeit war es, den Methylierungsstatus ausgewählter CpGs regulatorischer Regionen der Fanconi Anämie-Gene und des *BRCA1*-Gens an Tumorproben von Patientinnen mit familiärem Mammakarzinom zu untersuchen und zu klären, ob ein auffälliger Methylierungsstatus vorliegt. Die Analyse der DNA-Methylierung erfolgte mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung.

Das Untersuchungskollektiv bestand aus 26 Patientinnen mit gesichertem (*BRCA*-Mutations-trägerinnen (n = 8)) oder vermutetem familiärem Mammakarzinom (Kriterien des Deutschen Konsortiums für Erblichen Brust- und Eierstockkrebs (siehe Tabelle 3)). Von diesen 26 Patientinnen lag Tumorgewebe in Form von FFPE-Material vor. Des Weiteren wurde auch peripheres Blut der Patientinnen (n = 24) untersucht, um das Muster der DNA-Methylierung mit der konstitutionellen DNA-Methylierung, in einem anderen Gewebe der selben Person, vergleichen zu können. Man geht davon aus, dass die DNA-Methylierung des peripheren Blutes eher der konstitutionellen DNA-Methylierung entspricht, als Tumorgewebe, welches Veränderungen im Rahmen der Karzinogenese unterworfen ist. Für die Voruntersuchungen wurden zudem acht Mammakarzinomzelllinien analysiert, um eine Vorauswahl der Assays mit differentiellen Methylierungsmustern zu ermöglichen.

Als Kontrollgruppe für die gewebespezifische DNA-Methylierung im Brustdrüsengewebe diente gesundes Brustdrüsengewebe (n = 8). Eine Kontrollgruppe zur Beurteilung des durchschnittlichen Methylierungsstatus der zu untersuchenden Gene im Blut bestand aus DNA-Proben aus peripherem Blut von zehn gesunden weiblichen Probanden.

3.1 Analyse regulatorischer Regionen

Im Rahmen der Arbeit wurden Pyrosequenzier-Assays für die Fanconi Anämie-Gene und das *BRCA1*-Gen verwendet und die DNA-Methylierung regulatorischer Regionen (siehe Tabelle 6) dieser Gene untersucht, wie beispielsweise Promoterregionen. Zur sprachlichen Erleichterung wird im Folgenden der Begriff „DNA-Methylierung des Gens“ verwendet, welcher sich auf die untersuchte (regulatorische) Region dieses Gens bezieht.

3.2 Untersuchung des Degradationsgrades der DNA des FFPE-Tumorgewebes

Der Degradationsgrad (Qualität) der DNA aus FFPE-Tumorgewebe wurde mittels Kontrollgen-PCR bestimmt. Bei insgesamt 26 DNA-Proben konnten erfolgreich PCR-Produkte amplifiziert werden (siehe Tabelle 11). Darunter konnte bei vier Tumorproben (P3, P7, P16, P24) nur eine Bande generiert werden, wobei drei dieser Tumorproben (P3, P7, P24) auch in der Pyrosequenzierung z.T. (*FANCB*-Assay) nicht auszuwerten waren. Der größte Teil der Tumorproben (n=14) zeigte zwei Banden in der Kontrollgen-PCR und vier dieser Proben (P5, P8, P13, P23) zeigten Ausfälle in der Pyrosequenzierung (*FANCB*-Assay). Jeweils vier Tumorproben zeigten drei (P11, P15, P17, P25) bzw. vier (P4, P6, P10, P21) Banden in der Kontrollgen-PCR.

Tabelle 11: Ergebnisse der Kontrollgen-PCR nach Basenpaar Größe und Alter des FFPE-Materials

Tumorproben	Alter des FFPE-Materials (Jahre)	100 bp	200 bp	300 bp	400 bp	600 bp
P1	5	+	+	-	-	-
P2	3	+	+	-	-	-
P3	3	+	-	-	-	-
P4	2	+	+	+	+	-
P5	8	+	+	-	-	-
P6	1	+	+	+	+	-
P7	2	+	-	-	-	-
P8	8	+	+	-	-	-
P9	5	+	+	-	-	-
P10	3	+	+	+	+	-
P11	4	+	+	+	-	-
P12	8	+	+	-	-	-
P13	9	+	+	-	-	-
P14	2	+	+	-	-	-
P15	3	+	+	+	-	-
P16	4	+	-	-	-	-
P17	5	+	+	+	-	-
P18	7	+	+	-	-	-
P19	4	+	+	-	-	-
P20	7	+	+	-	-	-
P21	2	+	+	+	+	-
P22	10	+	+	-	-	-
P23	3	+	+	-	-	-
P24	3	+	-	-	-	-
P25	5	+	+	+	-	-
P26	6	+	+	-	-	-
P27	3	-	-	-	-	-
P28	2	-	-	-	-	-

+ = PCR Produkt vorhanden; - = kein PCR Produkt

Insgesamt zeigten zwei Tumorproben (P27, P28) bei zweimaliger Wiederholung in der Kontrollgen-PCR keine Amplifikate. Diese beiden Proben wiesen auch in einer Gelelektrophorese mit 500 ng genomischer DNA nur einen schwachen Schlier in niedrigem Basenpaar-Bereich auf. Die beiden Tumorproben wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

3.3 Optimierung der Assays zur Methylierungsanalyse von *BRCA*- und Fanconi Anämie-Genen

Die erste Etablierung der Assays wurde am Institut für Humangenetik in Kiel durch Marcin Szaumkessel durchgeführt (Szaumkessel et al., 2011). Bei der Etablierung der Assays wurden mit Hilfe von Kontrollen und Zelllinien die PCR- und Pyrosequenzier-Assays optimiert. Zunächst wurden die PCR-Bedingungen eingestellt und bei guten PCR-Banden mit der Pyrosequenzierung fortgefahren. Im Rahmen dieser Arbeit mussten die Assays auf FFPE-Proben und die verwendeten Zelllinien optimiert werden. Insgesamt gelang es, sieben von 14 Assays zu optimieren und mit diesen auswertbare Resultate zu gewinnen.

Einer der Assays, *FANCL*, lieferte in der Bisulfit-Pyrosequenzierung keine auswertbaren Resultate an FFPE-Material. Außerdem ließen sich die Kontrollen des *FANCG*-Assays in der Bisulfit-Pyrosequenzierung nicht auswerten (Ergebnisse siehe Tabelle 21). Im *BRCA1*-Assay konnten Kontrollen und FFPE-Material nicht erfolgreich optimiert werden, so dass nur einzelne Messwerte der Zelllinien vorliegen (siehe Tabelle 20). Mit dem *BRCA2*-(*FANCD1*) Assay konnten keine Ergebnisse erzielt werden. Die PCR Bedingungen konnten eingestellt werden und die Bisulfit-Pyrosequenzierung zeigte gute Signale. Allerdings traten in den Pyrogrammen zusätzlich unerwartete Peaks auf, so dass der Assay ausgeschlossen werden musste (siehe Kap. 3.9).

Tabelle 12: Assay-Optimierung

Assay	PCR Optimierung Kontrollen	PCR Optimierung Zelllinien	PCR Optimierung FFPE	Pyrosequenzierung	Auswertbare Ergebnisse
<i>FANCA</i>	+	+	+	+	Ja
<i>FANCB</i>	+	+	+	+	Ja
<i>FANCC</i>	+	+	+	+	Ja
<i>FANCD2</i>	+	+	+	+	Ja
<i>FANCE</i>	+	-	-	Entfällt	Nein
<i>FANCF</i>	+	+	+	-	Nein
<i>FANCG</i>	+	+	(+)	Ohne Kontrollen	Ohne Kontrollen
<i>FANCI</i>	-	-	-	Entfällt	Nein
<i>FANCL</i>	+	+	-	+	Ja
<i>FANCM</i>	+	+	-	-	Nein
<i>FANCI</i>	+	+	+	+	Ja
<i>FANCN</i>	+	+	+	+	Ja
<i>BRCA1</i>	+	+	-	Nur 5/8 Zelllinien	Nein
<i>BRCA2</i>	+	+	+	+	Nein

+ = erfolgreiche Durchführung; - = keine erfolgreiche Durchführung; (+) = eingeschränkte Durchführung

Die sieben nicht funktionierenden Assays mussten von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. In Abhängigkeit des Assays waren einzelne Proben (z.T. auch

Kontrollen) nicht auswertbar, so dass eine unterschiedliche Anzahl an Proben pro Assay auswertbar war und deren Ergebnisse in den Diagrammen wiederzufinden sind.

3.4 Definition differentieller DNA-Methylierung

Zur Beurteilung des Methylierungsstatus der untersuchten Tumorproben und der Mammakarzinomzelllinien wurde eine gewebespezifische Kontrollgruppe aus acht analysierten gesunden Brustdrüsengeweben verwendet. Bei der Untersuchung der DNA-Methylierung des peripheren Blutes der Patientinnen diente die DNA der Kontrollgruppe aus Blut von zehn gesunden weiblichen Probandinnen als Kontrolle des Methylierungsstatus. Der Bereich der normalen DNA-Methylierung für jeden Assay wurde definiert als Mittelwert der Methylierungswerte in der Kontrollgruppe \pm drei Standardabweichungen (STABW). Als DNA-Hypermethylierung bzw. Hypomethylierung wurden Methylierungswerte definiert, die ober-/unterhalb des Bereichs der normalen DNA-Methylierung (\pm 3 STABW) lagen.

3.5 Voruntersuchungen zur Auswahl informativer Assays

Um differentiell methylierte Gene zu identifizieren, wurde zunächst eine Bisulfit-Pyrosequenzierung an einem ausgewählten Probenkollektiv durchgeführt. Hierfür wurden acht Mammakarzinomzelllinien, vier FFPE-Tumoren und die acht Kontrollen aus gesundem Brustdrüsengewebe ausgewählt. Assays, in denen Zelllinien und FFPE-Proben keine Hypo- oder Hypermethylierung zeigten, wurden aus Gründen der Effektivität von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Durch die Voruntersuchungen konnten insgesamt fünf Assays (*FANCC*, *FANCD2*, *FANCL*, *FANCI* (*BRIP1*) und *FANCN* (*PALB2*)) ausgeschlossen werden, da diese keine unterschiedliche Methylierung zwischen Kontrollen, Mammakarzinomzelllinien und Tumoren zeigten. Zwei potentiell differentiell methylierte Gene konnten mit *FANCA* und *FANCB* identifiziert werden.

3.6 Ergebnisse der Pyrosequenzierungs-Assays ohne Hinweis auf differentielle Methylierung von Tumoren und Mammakarzinomzelllinien

Fünf Assays zeigten in den Voruntersuchungen kein differentielles Methylierungsmuster (siehe Abbildung 2 und Tabelle 22 bis 26 im Anhang). In drei dieser Assays (*FANCC*, *FANCL* und *FANCN* (*PALB2*)) wurden einzelne CpGs detektiert, die schwach hyper-

3 | Ergebnisse

methyliert waren. Die Anzahl der analysierten Positionen lag zwischen fünf bis zehn Einzel-CpGs und die Nachbar-CpGs waren normal methyliert. Die fünf Assays wurden aus Gründen der Effektivität von weiteren Untersuchungen am gesamten Kollektiv ausgeschlossen.

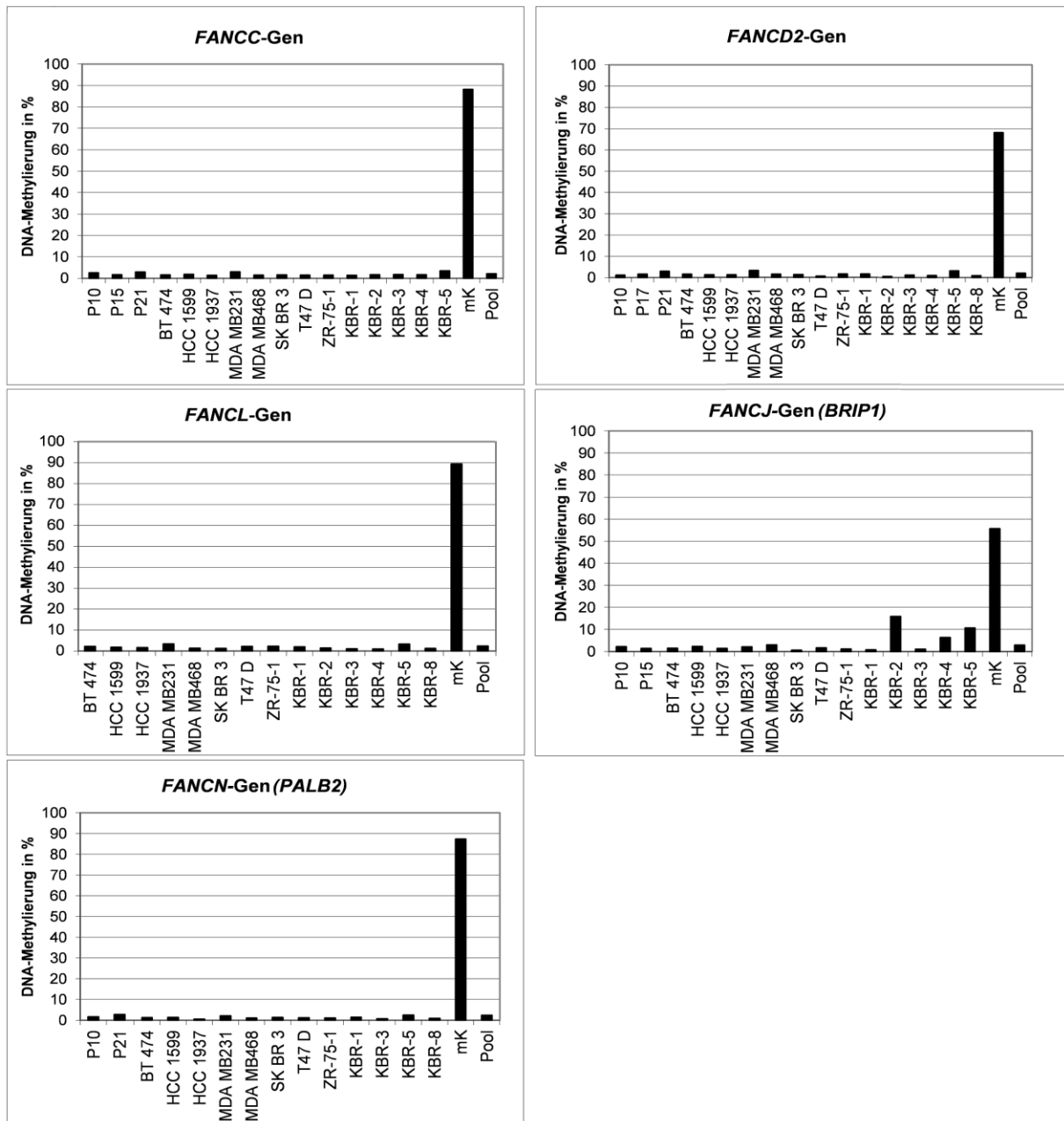


Abbildung 2: Graphische Darstellung der DNA-Methylierung des *FANCC*-, *FANCD2*-, *FANCI*- (*BRIP1*) und *FANCN*- (*PALB2*) Gens. Es konnte im Bereich der analysierten CpGs keine differentielle Methylierung zwischen den analysierten Patientenproben (Tumoren), Mammakarzinomzelllinien und den Kontrollen identifiziert werden. Die Tumoren sind mit P10, P15, P17 und P21 gekennzeichnet, wobei nicht alle Tumoren in den verschiedenen Assays auswertbar waren. Die Mammakarzinomzelllinien tragen ihre Eigennamen. Die Kontrollen aus Brustdrüsengewebe sind mit „KBR-“ abgekürzt und nummeriert. mK = methylierte Kontrolle; Pool = gepoolte DNA aus peripherem Blut.

3.7 Ergebnisse der Pyrosequenzierungs-Assays mit differentieller Methylierung von Tumoren und Mammakarzinomzelllinien

Durch die Voruntersuchungen konnten zwei von insgesamt sieben Genen identifiziert werden (*FANCA* und *FANCB*), in denen eine differentielle Methylierung in einzelnen Tumorproben und den Zelllinien identifiziert werden konnte. Mittels dieser Assays wurden alle Tumorproben, Zelllinien und Kontrollen analysiert.

3.7.1 DNA-Methylierung des *FANCA*-Gens

3.7.1.1 Methylierung des *FANCA*-Gens der gewebespezifischen Kontrollen

Die Kontrollen aus gesundem Brustdrüsengewebe (n=8) zeigten eine mittlere DNA-Methylierung von 64,8 % (Standardabweichung (STABW) = 5,4 %) der Promotorregion des *FANCA*-Gens. Die Kontrollen isoliert aus peripheren Blutproben gesunder Frauen (n =10) zeigten eine mittlere DNA-Methylierung von 76,0 % (STABW = 2,4 %). Der Bereich der Hypo-/Hypermethylierung (MW +/- 3 STABW) des *FANCA*-Gens wurde definiert als eine DNA-Methylierung von <48,5 % / >81,2 % in Tumoren und Mammakarzinomzelllinien und <68,9 % / >83,2 % für das periphere Blut.

3.7.1.2 Methylierung des *FANCA*-Gens in Mammakarzinomzelllinien

Bei der Untersuchung der Mammakarzinomzelllinien lagen drei (HCC 1937, MB231, ZR 75-1) von acht Mammakarzinomzelllinien im Normalbereich der DNA-Methylierung des gesunden Brustdrüsengewebes. Vier (HCC 1599, MB 468, SK BR-3, T47 D) von acht

Tabelle 13: DNA-Methylierung des *FANCA*-Gens in Mammakarzinomzelllinien

Proben	Gewebe	BRCA-Status	Erkrankungsalter	ÖR	PR	Her2	MW der DNA-Methylierung (%)
HCC 1599	Zelllinie	<i>BRCA2</i>	44	-	-	-	8
T47 D	Zelllinie	Negativ	54	+	+	-	9
SK BR 3	Zelllinie	Negativ	43	-	-	+	14
MDA MB468	Zelllinie	Negativ	51	-	k.A.	-	15
BT 474	Zelllinie	Negativ	60	-	-	+	51
ZR-75-1	Zelllinie	Negativ	63	+	-	-	72
MDA MB231	Zelllinie	Negativ	51	-	-	-	81
HCC 1937	Zelllinie	<i>BRCA1</i>	24	-	-	-	84
Mittelwert der Kontrollen							64,8
STABW							5,4
3x STABW							16,3

Normalmethylierte Werte sind in blau, hypomethylierte in grün und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. k.A. = keine Angabe; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor.

Mammakarzinomzelllinien zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine starke Hypomethylierung (MW der DNA-Methylierung = 11,5 %) des Promotorbereichs des *FANCA*-Gens (siehe Abbildung 3, Tabelle 13 sowie ausführliche Tabelle 27 im Anhang). Eine Mammakarzinomzelllinie (HCC 1937) mit einer *BRCA1*-Mutation zeigte eine grenzwertige Hypermethylierung (84 %).

3.7.1.3 Methylierung des *FANCA*-Gens im Tumorgewebe

Mittels des *FANCA*-Assays konnten 24 der 26 Tumorproben ausgewertet werden. Im Bereich des *FANCA*-Assays zeigten 14 Tumoren (P3, P1, P7, P10, P17, P26, P9, P25, P21, P24, P5, P16, P23, P12) eine normale Methylierung im Vergleich zu den gewebespezifischen Kontrollen aus gesundem Brustdrüsengewebe. Dagegen zeigten 10 der 24 (41,7 %) Tumoren (P2, P4, P8, P22, P13, P14, P6, P20, P18, P19) eine Hypomethylierung (MW = 35 %) des *FANCA*-Promotors (siehe Abbildung 3, Tabelle 19 (S. 32) sowie ausführliche Tabelle 27 im Anhang). Bis auf eine Tumorprobe mit Splice-Site Variante der *BRCA1*-Mutation waren alle vier *BRCA1* positiven Tumorproben (P4, P6, P8, P14) hypomethyliert und alle drei *BRCA2* (*FANCD1*) positiven Tumorproben (P5, P21, P26) wiesen einen normalen Methylierungsgrad auf. Klinische Daten wie Erkrankungsalter, Tumor-Stadium, Grading und Rezeptorstatus (Östrogen, Progesteron, Her2/neu) zeigten keine auffällige Verteilung.

3.7.1.4 Methylierung des *FANCA*-Gens im peripheren Blut von Mammakarzinom-Patientinnen

Für die Untersuchung des peripheren Blutes der Mammakarzinompatientinnen stand DNA von 22 der 24 Patientinnen zur Verfügung, deren Tumoren im *FANCA*-Assay auswertbar waren. Insgesamt lagen 17 der 22 DNA-Proben aus peripherem Blut der Mammakarzinompatientinnen im Normalbereich der gewebespezifischen Methylierung des *FANCA*-Gens, wie sie an Blutproben von gesunden Probanden ermittelt wurde. Fünf Blutproben der Mammakarzinompatientinnen (22,7 %) zeigten dagegen eine Hypermethylierung (siehe Abbildung 3, Tabelle 14 sowie ausführliche Tabelle 29 im Anhang). Im Tumorgewebe von vier dieser Proben (P2, P13, P14, P20) war *FANCA* hypomethyliert.

Tabelle 14: DNA-Methylierung des *FANCA*-Gens in hypermethylierten Blutproben und zugehörigen Tumoren von Mammakarzinompatientinnen

Proben	BRCA Status	Staging	Erkrankungsalter	Nodalstatus	Metastasierung	Grading	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)	
										MW peripheres Blut	MW der Tumorproben
P2	-	pT1c	39	pN0	M0	G2	+	+	+	84	16
P7	-	ypT1b	36	ypN1mi	Mx	k.A.	+	+	+	85	53
P13	-	pT1b	25	pN0	M0	G2	+	+	k.A.	86	34
P14	<i>BRCA1</i>	pT2	38	pN0	Mx	G3	+	+	+	87	40
P20	-	pT2	62	pN2a	M0	G2	+	+	+	85	43
Mittelwert der Kontrollen										76,1	64,8
STABW										2,4	5,4
3x STABW										7,1	16,3

Normalmethylierte Werte sind in blau, hypomethylierte in grün und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. k.A. = keine Angabe; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor

3.7.1.5 Zusammenfassung der Methylierungsanalysen des *FANCA*-Gens

Durch die vergleichenden Untersuchungen an acht Mammakarzinomzelllinien, 24 Mammakarzinomen und Blutproben von 22 Mammakarzinompatientinnen konnte gezeigt werden, dass *FANCA* beim familiären Mammakarzinom ein differentiell methyliertes Gen ist (siehe auch Tabelle 15). In einigen Tumoren und Mammakarzinomzelllinien konnte eine DNA-Hypomethylierung nachgewiesen werden. In einer Mammakarzinomzelllinie konnte zudem eine DNA-Hypermethylierung gezeigt werden. In der DNA isoliert aus peripherem Blut zeigte sich bei einigen Proben eine geringe DNA-Hypermethylierung.

Tabelle 15: Zusammenfassung der DNA-Methylierung des *FANCA*-Gens

Gewebe	Hypomethyliert (n=)	Normalmethyliert	Hypermethyliert (n=)
Tumoren	10 (41,7 %)	14 (58,3 %)	0
Mammakarzinomzelllinien	4 (50 %)	3 (37,5 %)	1 (12,5 %)
peripheres Blut von Mammakarzinom-Patientinnen	0	17 (77,3 %)	5 (22,7 %)

3.7.2 DNA-Methylierung des *FANCB*-Gens

3.7.2.1 Methylierung des *FANCB*-Gens der gewebespezifischen Kontrollen

Die Kontrollen aus gesundem Brustdrüsengewebe (n=8) zeigten eine mittlere DNA-Methylierung von 31,1 % (Standardabweichung (STABW) 1,9 %) der Promotorregion des *FANCB*-Gens. Die Kontrollen isoliert aus peripheren Blutproben gesunder Frauen (n=10) zeigten für *FANCB* eine mittlere DNA-Methylierung von 32,4 % (STABW = 2,1 %). Hypo-/Hypermethylierung (MW +/- 3 STABW) des *FANCB*-Gens wurde definiert als eine DNA-Methylierung von <25,3 % / >36,8 % in Tumoren und Mammakarzinomzelllinien und <26,2 % / >38,7 % für peripheres Blut der Mammakarzinompatientinnen.

3.7.2.2 Geschlechtsspezifische DNA-Methylierung des *FANCB*-Gens

Das *FANCB*-Gen ist im Gegensatz zu den anderen Fanconi Anämie-Genen X-chromosomal lokalisiert. In der Literatur ist demnach eine geschlechtsspezifische DNA-Methylierung dieses Gens beschrieben. Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurden in der vorliegenden Arbeit neben zehn peripheren Blutproben von gesunden Frauen auch zehn Blutproben von gesunden Männern als Kontrollen untersucht. Die vorliegenden Analysen zeigen ebenfalls eine geschlechtsspezifische DNA-Methylierung des *FANCB*-Gens im peripheren Blut (siehe Abbildung 4 und Tabelle 31 im Anhang). Die mittlere DNA-Methylierung betrug 32,4 % bei Frauen und 2,2 % bei Männern. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen damit die Beobachtung, dass das *FANCB*-Gen eine geschlechtsspezifische DNA-Methylierung besitzt. Als Kontrollen der DNA-Methylierung für die Blutproben der Mammakarzinompatientinnen wurden deshalb nur Blutproben von gesunden Frauen verwendet.

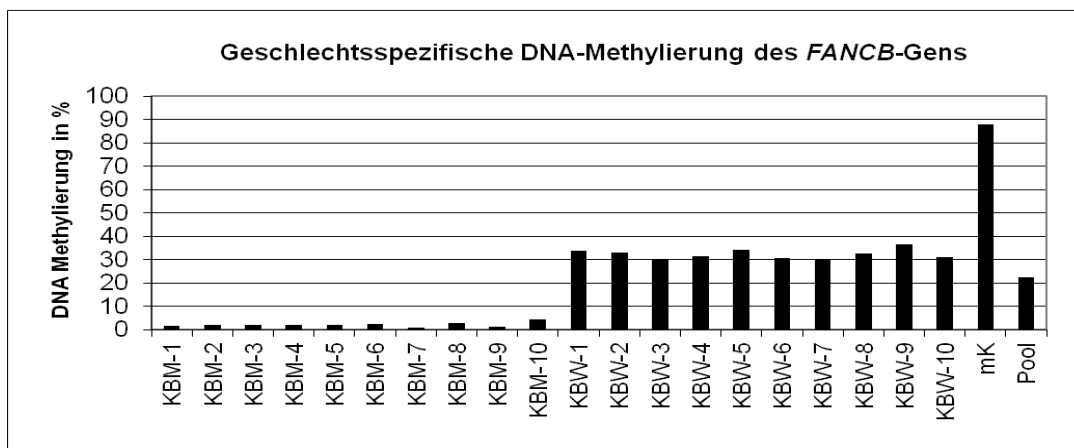


Abbildung 4: Graphische Darstellung der geschlechtsspezifischen DNA-Methylierung des *FANCB*-Gens der DNA des peripheren Blutes. Die weiblichen Blutproben sind mit „KBW-“ und die männlichen Blutproben mit „KBM-“ gekennzeichnet und numeriert. Die DNA isoliert aus Blut der weiblichen Kontrollgruppe zeigt einen deutlich höheren Methylierungsgrad gegenüber der männlichen Kontrollgruppe. mK = methylierte Kontrolle; Pool = gepoolte DNA aus peripherem Blut.

3.7.2.3 Methylierung des *FANCB*-Gens in Mammakarzinomzelllinien

Für das *FANCB*-Gen zeigten zwei der acht Mammakarzinomzelllinien gegenüber den gewebespezifischen Kontrollen eine normale Methylierung der Promotorregion. Sechs von acht (75 %) analysierten Mammakarzinomzelllinien zeigten dagegen eine Hypomethylierung des *FANCB*-Gens (siehe Abbildung 5, Tabelle 16 sowie ausführliche Tabelle 28 im Anhang). Die klinischen Daten (Erkrankungsalter etc.) wiesen keine auffällige Verteilung auf.

Tabelle 16: DNA-Methylierung des *FANCB*-Gens in Mammakarzinomzelllinien

Zelllinie	BRCA-Status	Erkrankungsalter	ÖR	PR	Her2	Mittelwert der DNA-Methylierung
MDA MB468	negativ	51	-	k.A	-	1
T47 D	negativ	54	+	+	-	1
BT 474	negativ	60	-	-	+	2
HCC 1599	<i>BRCA2</i>	44	-	-	-	2
MDA MB231	negativ	51	-	-	-	4
SK BR 3	negativ	43	-	-	+	20
ZR-75-1	negativ	63	+	-	-	27
HCC 1937	<i>BRCA1</i>	24	-	-	-	34
Mittelwert der Kontrollen						31,1
STABW						1,9
3 x STABW						5,7

Normalmethylierte Werte sind in blau, hypomethylierte in grün dargestellt.

k.A. = keine Angabe; ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor.

3.7.2.4 Methylierung des *FANCB*-Gens im Tumorgewebe

Mittels des *FANCB*-Assays konnten 18/26 Tumorproben analysiert werden. Die Untersuchung des Tumorgewebes zeigte dabei ein divergentes Bild (siehe Abbildung 5, Tabelle 19 sowie ausführliche Tabelle 28 im Anhang): Zwei Tumorproben (P9, P20) lagen im Normalbereich der Methylierung des gesundes Brustdrüsengewebes. Acht (P15, P2, P19, P12, P11, P18, P10, P21) von 18 (44,4 %) auswertbaren Tumorproben zeigten im Vergleich zu den gewebespezifischen Kontrollen eine Hypomethylierung (MW = 10,6 %), acht (P1, P26, P25, P6, P4, P14, P22, P16) von 18 (44,4 %) Tumorproben zeigten eine Hypermethylierung (MW = 49,4 %). Auffällig war, dass drei von vier *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (P4, P6, P14) eine Hypermethylierung der Tumor-DNA zeigten. Bei dem vierten Tumor mit *BRCA1*-Mutation (P10) handelt es sich im Gegensatz zu den anderen Tumoren nicht um eine Stop-Mutation, sondern um eine Splice-Site-Mutation. Die klinischen Daten (Erkrankungsalter, Tumorstadium, Grading, Rezeptorstatus etc.) zeigten keine auffällige Verteilung.

3.7.2.5 Methylierung des *FANCB*-Gens im peripheren Blut von Mammakarzinom-Patientinnen

Die Tumor-DNA von 18 von 26 Patientinnen konnte im *FANCB*-Assay ausgewertet werden. Von 16 der 18 Patientinnen stand DNA isoliert aus peripherem Blut zur Verfügung. Insgesamt zeigten 14 von 16 dieser Blutproben einen unauffälligen Methylierungsstatus gegenüber den gewebespezifischen Kontrollen aus peripherem Blut gesunder Probandinnen (siehe Abbildung 5 und Tabelle 17, sowie ausführliche Tabelle 30). Eine Patientin (P21),

DNA-Methylierung des FANCB-Gens

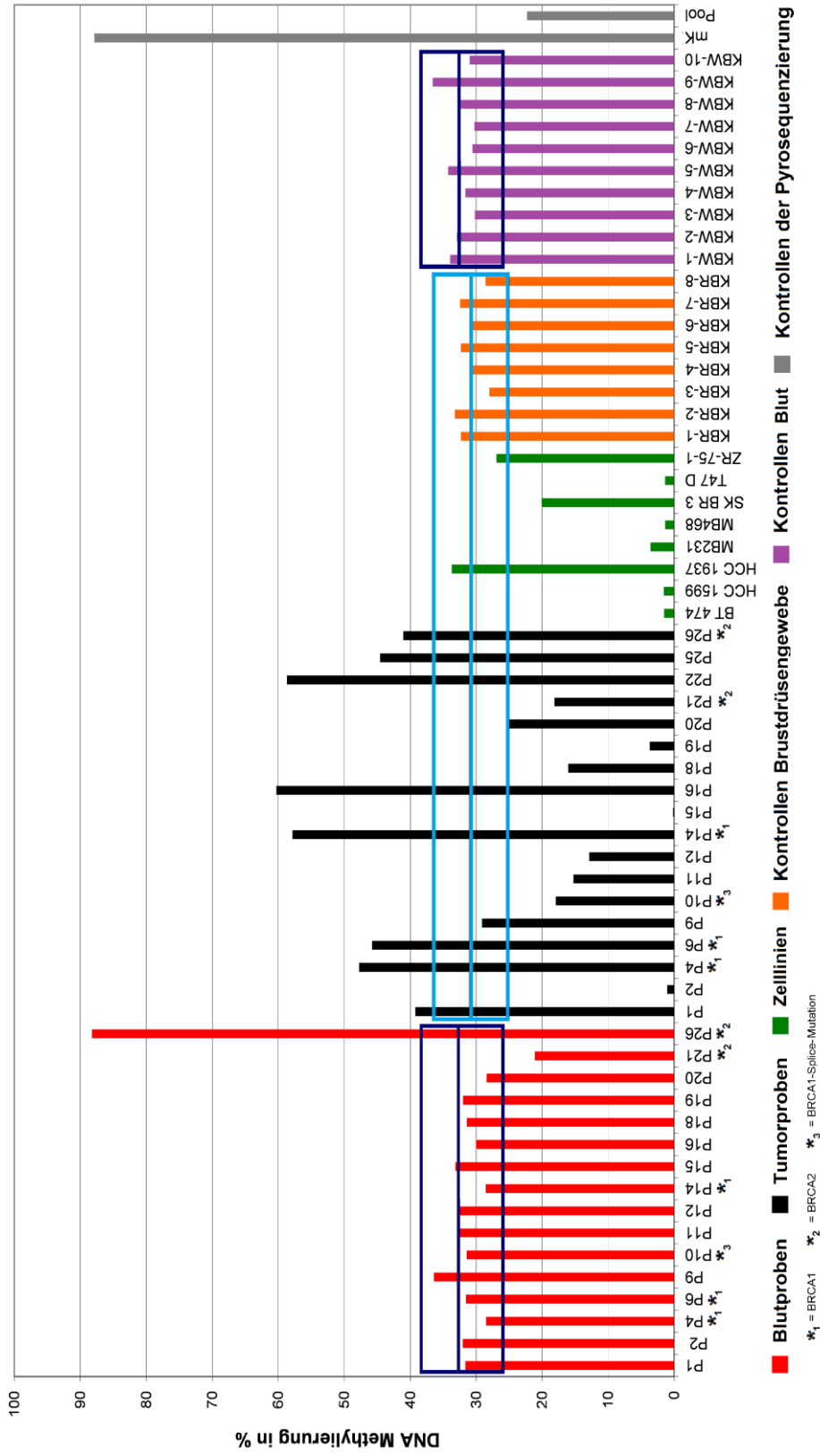


Abbildung 5: 8/18 Tumoren und 6/8 Mammakarzinomzelllinien zeigen eine DNA-Hypomethylierung im Vergleich zu den Kontrollen. 8/18 Tumoren weisen eine Hypomethylierung auf. Die verschiedenen Gewebetypen und Kontrollen sind jeweils farblich kodiert. Die blauen Kästchen geben den Bereich der normalen DNA-Methylierung an (hellblau = Brustdrüsenewebe; dunkelblau = Blutproben). Die Mittellinie der Kästchen gibt den Mittelwert der jeweiligen Kontrollen an. Die Tumoren mit *BRCA-1/2*-Mutation sind zusätzlich durch Sternchen markiert. Pool = methylierte Kontrolle; mK = gepoolte DNA aus peripherem Blut.

deren Tumor eine Hypomethylierung aufwies, zeigte auch im peripheren Blut eine geringe Hypomethylierung des *FANCB*-Promotors. Eine andere Patientin zeigte (P26) eine starke Hypermethylierung im peripheren Blut, während im Tumor dieser Patientin nur eine gering ausgeprägte Hypermethylierung vorhanden war.

Tabelle 17: DNA-Methylierung des *FANCB*-Gens in hypo- und hypermethylierten Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen

Probe	BRCA-Status	Staging	Erkrankungsalter	Nodalstatus	Grading	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)	
									MW Blutproben	MW Tumorproben
P21	<i>BRCA2</i>	pT2	58	pN1mi	G3	+	-	-	21	18
P26	<i>BRCA2</i>	pT2	33	pN1	G1	+	+	-	88	41
MW der Kontrollen									32,4	31,1
STABW									2,1	1,9
3x STABW									6,3	5,7

Normalmethylierte Werte sind in blau, hypomethylierte in grün und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor

3.7.2.6 Zusammenfassung der Methylierungsanalysen des *FANCB*-Gens

Durch die vergleichenden Untersuchungen an acht Mammakarzinomzelllinien, 18 Mammakarzinomen und peripherem Blut von 16 Mammakarzinompatientinnen konnte gezeigt werden, dass *FANCB* beim familiären Mammakarzinomen ebenso wie *FANCA* ein differentiell methyliertes Gen zu sein scheint. In Tumoren, peripherem Blut von Mammakarzinompatientinnen und Mammakarzinomzelllinien konnte eine DNA-Hypomethylierung nachgewiesen werden. In Tumoren und der DNA aus peripherem Blut der Mammakarzinompatientinnen konnte hingegen auch eine Hypermethylierung gemessen werden (siehe Tabelle 18). Zudem konnte gezeigt werden, dass das *FANCB*-Gen eine geschlechtsspezifische DNA-Methylierung aufweist.

Tabelle 18: Zusammenfassung der DNA-Methylierung des *FANCB*-Gens

Gewebe	Hypomethyliert (n=)	Normalmethyliert (n=)	Hypermethyliert (n=)
Tumoren	8 (44,4 %)	2 (11,2%)	8 (44,4 %)
Mammakarzinomzelllinien	6 (75 %)	2 (25 %)	0
peripheres Blut von Mammakarzinom-Patientinnen	1 (6,3 %)	14 (87,5 %)	1 (6,3 %)

3.8 Abhängigkeit der messbaren DNA-Methylierung vom Tumorzellgehalt in Paraffinschnitten

Die Methylierung der DNA variiert in Abhängigkeit vom Gewebetyp und somit auch zwischen Tumor und umgebendem Gewebe. DNA aus FFPE-Tumorgewebe enthält, da der

Tabelle 19: Zusammenfassung der DNA-Methylierung von *FANCA* und *FANCB* in Tumoren und Blut von Mammakarzinompatientinnen

Proben	Erkrankungsalter	BRCA Status	Staging	Nodalstatus	Metastasierung	Grading	ÖR	PR	Her2	Tumorzell-gehalt	DNA-Methylierung (%)			
											<i>FANCA</i> Tumor	<i>FANCA</i> Blut	<i>FANCB</i> Tumor	<i>FANCB</i> Blut
P1	83	negativ	rpT2	k.A.	k.A.	G2	+	+	+	>80	52	81	39	32
P2	39	negativ	pT1c	pN0	M0	G2	+	+	+	>80	16	84	1	32
P3	53	negativ	pT2	pN0	k.A.	G2	+	+	-	10-20%	51	82	na	-
P4	51	<i>BRCA1</i>	pT1c	pN1a	M0	G3	+	+	-	>80 (wenig LK)	24	83	48	29
P5	55	<i>BRCA2</i>	pT1c	pN0	M0	G3	+	+	+	50-60%	74	82	na	-
P6	40	<i>BRCA1</i>	ypT3	ypN1a	M0	Gx	-	-	-	40%	41	81	46	32
P7	36	negativ	ypT1b	ypN1mi	Mx	k.A.	+	+	+	100%	53	85	na	-
P8	53	<i>BRCA1</i>	pT1c	pN0	M0	G2	-	-	-	70%	31	79	na	-
P9	34	negativ	pT2	pN0	k.A.	G3	+	+	+	80%	68	83	29	36
P10	62	<i>BRCA1</i> SP	ypT3	pN0	M0	G3	+	+	-	50% (Z.n.Chemo.)	58	81	18	32
P11	59	negativ	ypT2	ypN0	k.A.	G3	-	-	-	40-50% (Nekrosen)	na	-	15	33
P12	59	negativ	rpT1	k.A.	k.A.	G2	+	+	-	20-25%	76	81	13	33
P13	25	negativ	pT1b	pN0	M0	G2	+	+	k.A.	5-10%	34	86	na	-
P14	38	<i>BRCA1</i>	pT2	pN0	Mx	G3	+	+	+	80%	40	87	58	29
P15	72	negativ	pT3	pN0	M0	G2	-	-	-	60%	na	-	0	33
P16	58	negativ	pT1c	pN0	M0	G3	-	+	+	>85% (ma)	75	83	60	30
P17	34	negativ	ypT1c	pN0	M0	G2	+	+	+	20-30%	64	83	na	-
P18	46	negativ	pT1c	pN2a	M0	G3	+	+	k.A.	40%	44	76	16	31
P19	47	negativ	pT3	pN3a	M0	G3	+	+	+	50% (LK)	45	78	4	32
P20	62	negativ	pT2	pN2a	M0	G2	+	+	+	50-60%	43	85	25	28
P21	58	<i>BRCA2</i>	pT2	pN1mi	M0	G3	+	-	-	>80%	69	77	18	21
P22	44	negativ	pT3	pN0	M0	G2	+	-	+	30%	34	na	59	na
P23	35	negativ	pT1c	pN0	M0	G2	+	+	-	20%	75	80	na	-
P24	60	negativ	pT1c	pN0	pMx	G2	+	+	-	15-20%	74	82	na	-
P25	65	negativ	pT1c	pN1	M0	G2	+	+	+	>85% (ma)	69	na	45	na
P26	33	<i>BRCA2</i>	pT2	pN1	k.A.	G1	+	+	-	20%	65	80	41	88
HCC 1599	44	<i>BRCA2</i>	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	-	E	8	-	2	-
T47 D	54	negativ	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	+	+	k.A.	E	9	-	1	-
SK BR 3	43	negativ	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	+	E	14	-	20	-
MDA MB468	51	negativ	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	E	15	-	1	-
BT 474	60	negativ	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	E	51	-	2	-
ZR-75-1	63	negativ	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	+	-	k.A.	E	72	-	27	-
MDA MB231	51	negativ	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	-	k.A.	k.A.	E	81	-	4	-
HCC 1937	24	<i>BRCA1</i>	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	-	E	84	-	34	-
Mittelwert der Kontrollen aus gesundem Brustdrüsengewebe											64,8	-	31,1	-
Mittelwert der Kontrollen isoliert aus Blut											-	76,1	-	32,4
Standardabweichung der Kontrollen											5,4	2,4	1,9	2,1

Normalmethylierte Werte sind in blau, hypomethylierte in grün und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. LK = Lymphknoten in Schnitten; ma = manuell angereichert; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert;

STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt; na = nicht auswertbar.

Tumor i. d. R. nicht klar von der Umgebung abzugrenzen ist, nicht nur DNA aus Tumorzellen, sondern auch DNA von anderen, umliegenden Geweben. Um einen eventuellen Einfluss des umgebenden Gewebes auf den gemessenen Grad der DNA-Methylierung abschätzen zu können, wurde der Tumorzellgehalt anhand histologischer Schnitte bestimmt und vergleichend dem Grad der DNA-Methylierung gegenübergestellt (Siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Bei der Auswertung wurden die einzelnen Tumorproben dafür in drei Gruppen eingeteilt mit niedrigem (0-30 %), mittlerem (30-60 %) und hohem (60-100 %) Tumorzellgehalt.

3.8.1.1 Methylierung des *FANCA*-Gens und *FANCB*-Gens in Abhängigkeit vom Tumorzellgehalt

In Abbildung 6 und Abbildung 7 ist die DNA-Methylierung des *FANCA*- und *FANCB*-Gens in Abhängigkeit des Tumorzellgehalts dargestellt. Dabei sind die einzelnen Proben als Punktwerte aufgetragen und die absoluten Abweichungen der DNA-Methylierung vom Mittelwert der zugehörigen Kontrollen (gesundes Brustdrüsengewebe) dargestellt.

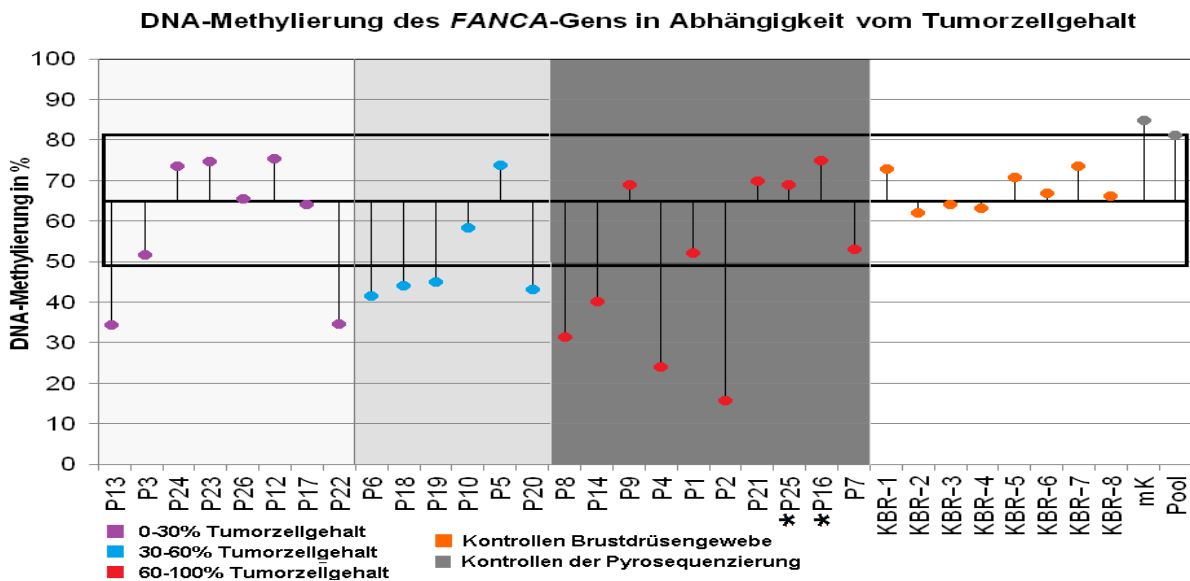


Abbildung 6: DNA-Methylierung des *FANCA*-Gens in Abhängigkeit vom Tumorzellgehalt. Das Diagramm zeigt die Punktwerte und die absoluten Abweichungen der einzelnen Proben vom Mittelwert der Kontrollen (gesundes Brustdrüsengewebe). Die Tumoren sind nach ihrem Tumorzellgehalt in drei Gruppen eingeteilt (0-30 % (hellgrauer Bereich), 30-60 % (grauer Bereich), 60-100 % (dunkelgrauer Bereich)) und die Proben sind zudem farblich kodiert. Der schwarze Kasten gibt den Bereich der normalen DNA-Methylierung an und die Mittellinie den Mittelwert der zugehörigen Kontrollen. Die Kontrollen aus Brustdrüsengewebe sind mit „KBR-“ gekennzeichnet und nummeriert. P25/P16 * = Tumorzellgehalt manuell angereichert; mK = methylierte Kontrolle; Pool gepoolte DNA aus peripheren Blutproben.

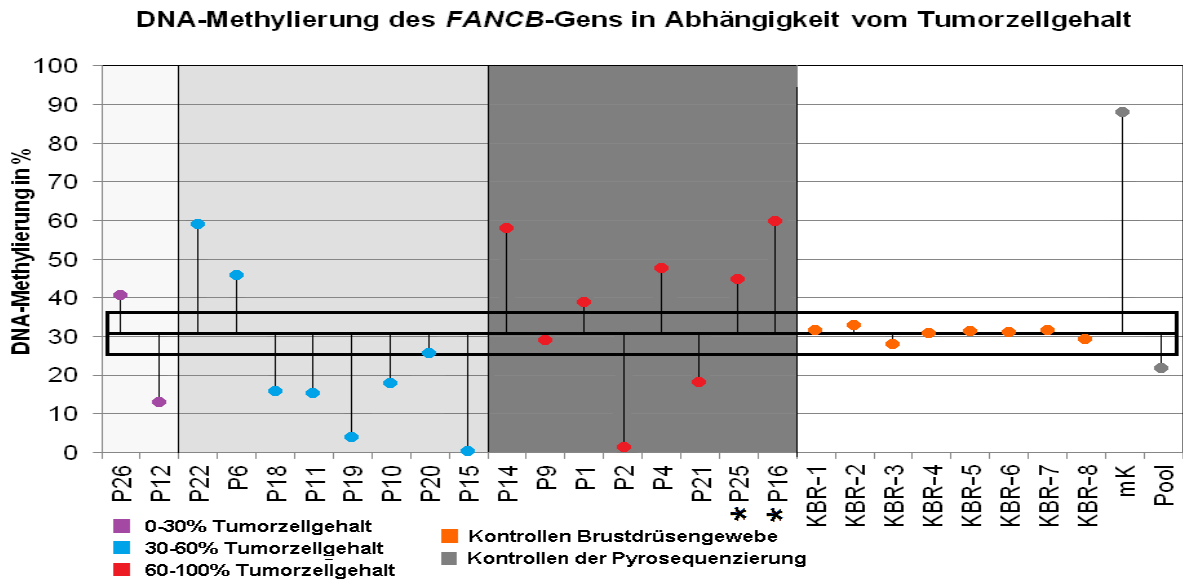


Abbildung 7: DNA-Methylierung des *FANCB*-Gens in Abhängigkeit vom Tumorzellgehalt. Das Diagramm zeigt die Punktwerte und die absoluten Abweichungen der einzelnen Proben vom Mittelwert der Kontrollen (gesundes Brustdrüsengewebe). Die Tumoren sind nach ihrem Tumorzellgehalt in drei Gruppen eingeteilt (0-30 % (hellgrauer Bereich), 30-60 % (grauer Bereich), 60-100 % (dunkelgrauer Bereich)) und die Proben sind zudem farblich kodiert. Der schwarze Kasten gibt den Bereich der normalen DNA-Methylierung an und die Mittellinie den Mittelwert der zugehörigen Kontrollen. Die Kontrollen aus Brustdrüsengewebe sind mit „KBR-“ gekennzeichnet und nummeriert. P25/P16 * = Tumorzellgehalt manuell angereichert; mK = methylierte Kontrolle; Pool gepoolte DNA aus peripheren Blutproben.

Insgesamt zeigte sich in beiden Assays keine deutliche Abhängigkeit der DNA-Methylierung vom Tumorzellgehalt. Die extremsten Werte finden sich zwar in den Gruppen mit mittlerem und hohem Tumorzellgehalt, aber insgesamt sind die Werte relativ gleichmäßig über die Gruppen verteilt. Auch in der Gruppe mit niedrigem Tumorzellgehalt finden sich viele Proben mit deutlich verändertem Methylierungsmuster.

3.9 Pyro- und Sanger-Sequenzierung des *BRCA2-(FANCD1)* Gens

Das *BRCA2-(FANCD1)* Gen zeigte in der Bisulfit-Pyrosequenzierung in einem Großteil der DNA-Proben (13/20 Tumoren, methylierte Kontrolle und Pool) auffällige Pyrogramme: Es traten unspezifische Peaks auf, deren Ursprung unklar war. Die PCR und die Signale der Pyrosequenzierung waren qualitativ gut, die Kontroll-Positionen der Natriumbisulfit-konversion waren unauffällig und die unspezifischen Peaks traten nur an bestimmten Positionen der Sequenz auf, welche ansonsten keine Abweichungen von der erwarteten Basenfolge zeigte. Die unspezifischen Peaks traten in drei unabhängigen Pyrosequenzierungsläufen auf und parallel laufende Assays konnten problemlos ausgewertet werden. Aufgrund

3 | Ergebnisse

dieser Merkmale konnte ein technisches Problem als Ursache der unspezifischen Peaks ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 8). Die unspezifischen Peaks traten in den einzelnen Proben mit unterschiedlich starker Ausprägung (höhe der Peaks) auf. Dabei waren diese in allen Proben stets an bestimmten Positionen der Sequenz zu finden (siehe Abbildung 8). Diese veränderten Pyrogramme traten sowohl in Tumorproben als auch in den Zelllinien und den Kontrollen auf, so dass es sich nicht um einen Effekt der Konservierung des Tumorgewebes als FFPE oder um eine tumor-assoziierte Veränderung handeln konnte.

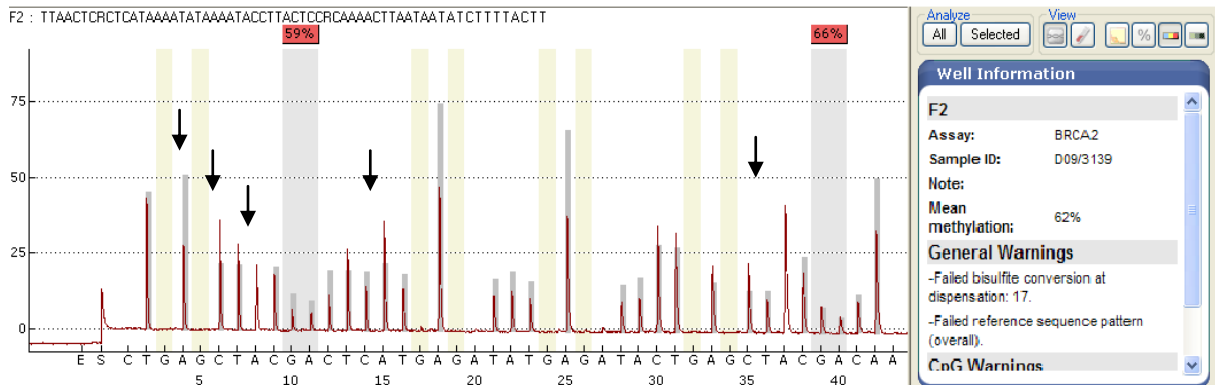


Abbildung 8: Pyrogramm des *BRCA2-(FANCD1)* Gens einer Tumorprobe mit starken Sequenzabweichungen. Es findet sich ein zu kleiner Peak an Position 4, sowie zu hohe Peaks an Position 6 und 15 im Verhältnis zu der erwarteten Peakhöhe (graue Balken). Außerdem finden sich unspezifische Peaks an Position 8 und 37 (Positionen markiert durch schwarze Pfeile).

Um die Ursache der Sequenzabweichungen zu klären, wurde zusätzlich eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Diese Analysen wurden im Onkologischen Labor der Universitäts-Frauenklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Walter Jonat) durchgeführt. Mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung sollten Mutationen oder Annotationsfehler innerhalb der untersuchten Region untersucht werden. Die Sequenzierungen zeigten ein Hintergrundrauschen insbesondere hinter einem Bereich mit zehn Mononukleotid-Wiederholungen (Poly-Adenosinmononukleotid-Stretch; siehe Abbildung 9). Es konnten in den Sequenzierungen keine eindeutigen Abweichungen zur bekannten DNA-Sequenz gefunden werden. Es ist davon auszugehen, dass in dieser Region keine Annotationsfehler oder Mutationen des *BRCA2-(FANCD1)* Gens in den untersuchten Proben vorliegen.

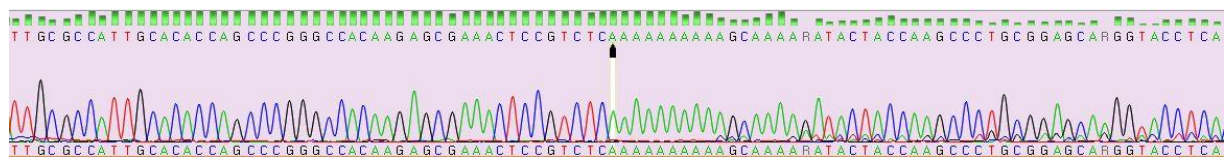


Abbildung 9: Sanger-Sequenzierung des *BRCA2-(FANCD1)* Gens anhand von DNA einer Blutprobe

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Familie der Fanconi Anämie-Gene sowie das *BRCA1*-Gen auf das Vorliegen von differentieller Methylierung im Tumorgewebe von Mammakarzinom-Patientinnen mit familiärer Disposition untersucht. Zusätzlich wurde auch das Blut dieser Patientinnen untersucht, um die konstitutionelle Methylierung der Gene bestimmen zu können. Ziel der Arbeit war es, mit molekular-genetischen Methoden zu prüfen, ob DNA-Hyper- und/oder Hypomethylierung der Fanconi Anämie-Gene bei Patientinnen mit familiärem Mammakarzinom zu identifizieren sind.

Das bekannte Brustkrebsgen *BRCA2* (*FANCD1*) ist ebenfalls ein Fanconi Anämie-Gen und ist mit einer sehr hohen Penetranz des Mammakarzinoms verbunden (relatives Risiko >10.0 %). Die Hochrisikogene *BRCA1* und *BRCA2* (*FANCD1*) erklären 15-25 % der erblichen Komponente des Mammakarzinoms, wobei der größte Teil weiterhin ungeklärt bleibt (Antoniou and Easton, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Keimbahnmutationen der Gene *FANCN* (*PALB2*) und *FANCI* (*BRIP1*) ein erhöhtes Brustkrebsrisiko (relatives Risiko *FANCN* = 2.3 %, *FANCI* = 2.0 %) verursachen können und einen kleinen Teil der familiären Mammakarzinome verursachen (Rahman et al., 2006; Seal et al., 2006).

Epigenetische Veränderungen einzelner Gene wurden bisher im Rahmen des familiären Mammakarzinoms nur wenig untersucht. Eine Studie berichtet, dass der Promotorbereich des *FANCN* (*PALB2*)-Gens in sporadischen und in familiären Mammakarzinomen hypermethyliert ist und dieses mit einer 28fach niedrigeren Expression des Proteins einhergeht (Potapova et al., 2008). Das in der Studie von Potapova et al. (2008) beobachtete Auftreten von DNA-Hypermethylierung war außerdem häufiger als die in der Population vorkommende Rate von Punktmutationen in *FANCN* (*PALB2*) in Mammakarzinomen von *BRCA1/2*-negativen Familien.

Auch für das *BRCA1*-Gen konnte eine große Studie (n=268) zeigen, dass in 12 % der sporadischen, in 6 % der *BRCA1*-positiven, 9 % der *BRCA2*-positiven und in 3 % der familiären Mammakarzinome ohne *BRCA1/2*-Mutation eine Hypermethylierung dieses Gens auftrat (Esteller et al., 2000; Esteller et al., 2001). Neuere Studien zeigen sogar in 42-51 % der familiären Mammakarzinome ohne *BRCA1/2*-Mutation sowie in 29,8 % der sporadischen

Mammakarzinome eine Hypermethylierung der Promotorregion (Wei et al., 2005; Honrado et al., 2007; Tapia et al., 2008). Eine weitere Studie konnte auch eine konstitutionelle DNA-Hypermethylierung des *BRCA1*-Gens in Blut- und Mundschleimhautzellen einer Patientin mit Mammakarzinom zeigen, welche auch im Tumorgewebe der Patientin zu finden war (Snell et al., 2008). Dieses deutet darauf hin, dass *BRCA1*-Hypermethylierung bzw. epigenetische Mechanismen im Allgemeinen bei der Entstehung der familiären Disposition des Mammakarzinoms eine Rolle spielen könnten. Es ist zu vermuten, dass insbesondere epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierung im Rahmen der familiären Krebs syndrome eine Rolle spielen. Mehrere Studien zum hereditären Kolonkarzinom konnten eine konstitutionelle Hypermethylierung des *MLH1*- und *MSH2*-Gens zeigen, die mit der Entstehung der Karzinome assoziiert war (Gazzoli et al., 2002; Suter et al., 2004; Hitchins et al., 2005; Chan et al., 2006; Hitchins and Ward, 2009).

Auch bei weiteren Krebserkrankungen (z.B. Kopf-Hals-Karzinome, Bronchialkarzinom, Zervixkarzinom, sporadisches Mammakarzinom, akute Leukämien (AML), Larynxkarzinom), konnten veränderte Methylierungsmuster der *BRCA*- und Fanconi Anämie-Gene beobachtet werden (Marsit et al., 2004; Narayan et al., 2004; Cucer et al., 2008; Hess et al., 2008; Smith et al., 2010; Szaumkessel et al., 2011).

Durch die vorliegenden Untersuchungen der Fanconi Anämie-Gene bei familiären Mammakarzinomen und Mammakarzinomzelllinien konnten mit *FANCA* und *FANCB* zwei Gene identifiziert werden, die ein gegenüber den gewebespezifischen Kontrollen auffälliges Methylierungsmuster an dem verwendeten Patientenkollektiv zeigen. Fünf Fanconi Anämie-Gene (*FANCC*, *FANCD2*, *FANCL*, *FANCI* (*BRIP1*) und *FANCN* (*PALB2*)) zeigen dagegen keine auffällige DNA-Methylierung. Im *FANCA*-Gen zeigten 41,7 % der Tumoren und 62,5 % der Mammakarzinomzelllinien ein aberrantes Methylierungsmuster. Im *FANCB*-Assay zeigten sogar 88,8 % der primären Tumoren und 75 % der Mammakarzinomzelllinien eine veränderte DNA-Methylierung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass differentielle DNA-Methylierung des *FANCA*- und *FANCB*-Gens mit der Entstehung des familiären Mammakarzinoms assoziiert ist. Auffälligerweise wurde in den Proben überwiegend eine DNA-Hypomethylierung der Gene gefunden.

In den folgenden Kapiteln soll diskutiert werden, welche Auswirkung die identifizierte DNA-Hyper- und Hypomethylierung auf die Pathogenese des familiären Mammakarzinoms haben

könnte. Zudem sollen die einzelnen Probleme des Untersuchungsmaterials sowie der verwendeten Methoden dargestellt und kritisch betrachtet werden.

4.1 Fanconi Anämie und Mammakarzinom

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fanconi Anämie-Gene und ihre DNA-Methylierung hinsichtlich Veränderungen beim familiären Mammakarzinom untersucht. Interessanterweise weisen Fanconi Anämie-Patienten im Gegensatz zu anderen malignen Erkrankungen wie z.B. Kopf-Hals-Karzinome (500-700fach erhöhtes Risiko) nur ein gering erhöhtes Risiko für das Mammakarzinom auf (Auerbach, 2009). Es konnte dennoch in strukturellen Veränderungen (Mutationen) der Gene *FANCF* (*BRIP1*) und *FANCG* (*PALB2*) eine Ursache für die Entstehung hereditärer Mammakarzinome gefunden werden (Rahman et al., 2006; Seal et al., 2006). Warum es dennoch bei Fanconi Anämie-Patienten nur selten zu Mammakarzinomen kommt, ist bisher wenig untersucht. Es wird angenommen, dass endokrine Faktoren und insbesondere ein Hypogonadismus mit verminderten Östrogenspiegeln bei diesen Patienten eine entscheidende protektive Bedeutung hinsichtlich der Entwicklung von Mammakarzinomen haben. Des Weiteren ist das durchschnittliche Überlebensalter (ca. 24 Jahre) von Fanconi Anämie-Patienten vor allem auf Grund von hämatologischen Komplikationen deutlich reduziert. Bei *BRCA2* (*FANCD1*)-Mutationsträgerinnen kommt es meist erst im vierten Lebensjahrzehnt zur Entstehung von Mammakarzinomen, so dass es vermutlich auch wegen der geringen Lebenserwartung selten zur Ausprägung dieser Karzinome bei Fanconi Anämie-Patienten kommt (Kutler et al., 2003; D'Andrea, 2010).

Eine weitere Frage ist, weshalb Genmutationen in kodierenden Regionen von nur drei Fanconi Anämie-Genen offenbar eine Disposition für Mammakarzinome bei nicht Fanconi-Anämie Patienten hervorrufen. Mehrere Arbeiten konnten keine Sequenzveränderungen in den anderen Fanconi Anämie-Genen in einem Kollektiv von Personen mit familiärer Disposition für ein Mammakarzinom finden (Seal et al., 2003). *FANCF* (*BRIP1*), *FANCG* (*PALB2*) und *BRCA2* (*FANCD1*) liegen im Fanconi-Anämie-Pathway stromabwärts der anderen Fanconi Anämie-Proteine. Es wird daher angenommen, dass diese unabhängig von den anderen Genen an der Schadenserkennung und Reparatur von DNA-Quervernetzungen beteiligt sind und eine bedeutendere Funktion haben als die anderen Proteine des Fanconi-Anämie-Komplexes (D'Andrea, 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass veränderte Methylierungsmuster des *FANCA*- und *FANCB*-Gens im Tumorgewebe familiärer Mammakarzinome rekurrent auftreten (*FANCA/FANCB*: 41,7/88,8 % der Primärtumoren). Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist zu vermuten, dass das *FANCA*- und das *FANCB*-Gen in der Karzinogenese des familiären Mammakarzinoms eine Veränderung des DNA-Methylierungsmusters durchlaufen. Es ist aber unklar, welche funktionellen Auswirkungen diese Veränderungen haben. Die Bedeutung konstitutioneller Veränderungen des Methylierungsgrades dieser Gene (*FANCA*: n = 5/22, *FANCB* n = 2/16) und eine evtl. Auswirkung auf die Disposition des familiären Mammakarzinoms, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden (Siehe auch Kap. 4.10.5).

4.2 DNA-Methylierung in verschiedenen Geweben

Die DNA-Methylierung ist einer der wichtigsten epigenetischen Mechanismen und hat eine große Bedeutung für die Differenzierung der einzelnen Zelle. Die DNA-Methylierung stellt dabei einen „stabilen“ Mechanismus dar, um die Expression von Genen zu steuern. Dennoch wird eine gewisse Plastizität der Zelle aufrecht erhalten, um sich an Umwelteinflüsse zu adaptieren oder auf Entwicklungssignale reagieren zu können. DNA-Methylierung und weitere epigenetische Mechanismen ermöglichen es, ein Expressionsmuster aufrecht zu erhalten, welches für einen Zelltyp und ein Gewebe charakteristisch ist (Bird, 2002; Rottach et al., 2009). Bei der Untersuchung von DNA-Methylierung findet man deshalb gewebe-spezifische Methylierungsmuster. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten für das *FANCA*-Gen eine mittlere Methylierung des gesunden Brustdrüsengewebes von 64,8 % und für das Blut der Kontrollgruppe von 76,1 %. Das *FANCB*-Gen zeigte dagegen einen übereinstimmenden Methylierungsgrad der Kontrollen von Brustdrüsengewebe und Blut (31,1/32,4 %). Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die in der Literatur beschriebene „Gewebespezifität“ der DNA-Methylierung.

4.3 Definition differentieller DNA-Methylierung

Hyper- und Hypomethylierung der DNA wird in der Literatur unterschiedlich definiert. Eine allgemein gültige oder akzeptierte Standard-Definition für die Ergebnisse von Pyrosequenzierungen gibt es zurzeit noch nicht. Dies liegt daran, dass verschiedene Methoden zur Messung des Methylierungsgrades angewandt werden und einige weit verbreitete Methoden wie die MSP oder COBRA hauptsächlich qualitative Aussagen zulassen

(Ammerpohl et al., 2009). Bei diesen Methoden kann nur zwischen methyliert und unmethyliert unterschieden werden (Bock et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde die Grenze zwischen Hyper-, Normal- und Hypomethylierung durch die dreifache Standardabweichung vom Mittelwert der gewebespezifischen Kontrollen definiert. Diese Definition wird auch in der aktuellen Literatur empfohlen (Muggerud et al., 2010). Die Definition aberranter DNA Methylierung durch eine Standardabweichung vom Mittelwert stellt eine Näherung dar, um ein Maß für eine „unveränderte“ DNA-Methylierung zu finden.

4.4 Untersuchung von DNA-Methylierung in Zelllinien

Bei Tumorzelllinien handelt es sich in der Regel um immortalisierte Zellen, die sich in vitro unbegrenzt kultivieren lassen und somit ein gutes Untersuchungsmaterial für molekulargenetische Methoden darstellen. Ein großer Vorteil besteht darin, dass Zelllinien in der Regel „frei“ von Zellkontamination durch umgebendes Gewebe sind (100 % Tumorzellgehalt) und einen einzelnen Tumorzelltyp repräsentieren. Allerdings können auch Probleme durch Kreuzkontamination oder durch die Kultivierung entstehen, welches zu verfälschten Ergebnissen führt. Zelllinien können sich im Laufe der Kultivierung und durch Selektion eines Tumorzelltyps verändern, weshalb von Passage zu Passage die Verwandtschaft der Zelllinie zum Primärtumor abnehmen kann. Es bleibt deshalb fraglich, inwiefern eine Zelllinie den eigentlichen Primärtumor zuverlässig widerspiegelt. Die Informationen, die aus Zelllinien gewonnenen wurden, müssen deshalb vorsichtig interpretiert werden, da zwischen Effekten der Zellkultivierung und der eigentlichen Transformation der Tumorzelle unterschieden werden muss (Paz et al., 2003).

Auf dem Gebiet der Epigenetik konnte gezeigt werden, dass Karzinomzelllinien den Typ des Primärtumors gut reflektieren. Das Methylierungsmuster von Zelllinien zeigt ein ähnliches Muster wie das des zugehörigen Primärtumors. Es ist anhand des Methylierungsmusters verschiedener Gene z.T. möglich, einzelne Zelllinien der Art des Primärtumors zuzuordnen (Paz et al., 2003). Die gleiche Studie zeigte jedoch auch, dass Karzinomzelllinien insgesamt eine stärkere DNA-Methylierung der CpG-Islands aufweisen, als die eigentlichen Primärtumoren. Gleichzeitig war die genomweite Hypomethylierung in den Zelllinien stärker ausgeprägt als in den Primärtumoren (Paz et al., 2003). Weitere Studien zu diesem Thema zeigen ebenfalls eine höhere Prävalenz von DNA-Hypermethylierung der CpG-Islands in Zelllinien (Antequera et al., 1990; Dammann et al., 2000; Smiraglia et al., 2001).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen in Mammakarzinomzelllinien insbesondere eine ausgeprägtere Hypomethylierung in beiden differentiell methylierten Genen und bestätigen die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen zu Karzinomzelllinien, wonach die Ausprägung des Methylierungsmusters der CpG-Islands von Genen stärker ausfällt als in Primärtumoren.

4.5 Auswahl von Kontrollen der DNA-Methylierung des Tumorgewebes

Als Kontrollen der DNA-Methylierung im Tumorgewebe der Mammakarzinome wurde Brustdrüsengewebe verwendet, welches aus kosmetischen oder orthopädischen Gründen entnommen wurde. Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, dass eine Gewebeprobe im Rahmen einer kontralateralen Anpassungsplastik einer Mammakarzinompatientin gewonnen wurde. Die histopathologische Beurteilung dieser Kontrolle war unauffällig, so dass eine Entartung des Gewebes im Sinne eines Mammakarzinoms oder einer Vorstufe ausgeschlossen wurde. Veränderungen der DNA-Methylierung sowie eine konstitutionelle Komponente der DNA-Methylierung in dieser Kontroll-Probe sind deshalb nicht auszuschließen. Die Daten, die mit dieser Kontrolle gewonnen wurden, sind deshalb als eingeschränkt zuverlässig anzusehen. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Fanconi Anämie-Gene zeigten keine wesentlichen Abweichungen zwischen dieser Probe und den anderen sieben gesunden Brustdrüsengeweben, so dass ein Ausschluss dieser Probe nicht als notwendig angesehen wurde.

4.6 Bisulfit-Pyrosequenzierung als geeignete Methode zur Quantifizierung der DNA-Methylierung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bisulfit-Pyrosequenzierung verwendet, um den Methylierungsgrad einzelner CpGs zu ermitteln. In vielen älteren Arbeiten zur DNA-Methylierung wurden Methoden wie z.B. die MSP oder COBRA (Combined bisulfite restriction analysis) gewählt, mit welchen jedoch nicht so zuverlässige Daten generiert werden können (Ammerpohl et al., 2009). Die MSP liefert im Gegensatz zur Bisulfit-Pyrosequenzierung keine echten quantitativen Ergebnisse und eine quantitative Abschätzung der DNA-Methylierung kann nur ungenau erfolgen. Mit der Bisulfit-Pyrosequenzierung lässt sich dagegen eine genaue Aussage über den Methylierungsgrad des untersuchten CpGs machen. Die MSP ist zwar eine sensitive und spezifische Methode, unter bestimmten Bedingungen (Klonalität, unspezifisches Primer-Annealing) kommt es jedoch zu falsch-positiven oder falsch-negativen Werten. Die Bisulfit-Pyrosequenzierung funktioniert vor allem an kurzen DNA-Fragmenten mit 100-150 bp und ist dadurch besser für fragmentierte

DNA geeignet als die MSP (Colella et al., 2003; Mikeska et al., 2007). Für die Methylierungsanalyse des *MGMT*-Gens sind z.B. deutliche Probleme bei der Analyse von FFPE-Tumormaterial von Glioblastomen mit der MSP beschrieben worden (Hegi et al., 2005). Bei der Bisulfit-Pyrosequenzierung, die wie die COBRA-Methode mit bisulfitkonvertierter DNA arbeitet, kann die Qualität der Natriumbisulfitkonversion überprüft werden. Dieses macht sie weniger anfällig für Störungen, die bei der Natriumbisulfitkonversion auftreten können (Mikeska et al., 2007). Ein wesentlicher Vorteil der Bisulfit-Pyrosequenzierung ist außerdem, dass mehrere benachbarte CpGs gleichzeitig analysiert werden können, so dass anhand mehrerer CpGs auch eine genauere Aussage über den Zustand der CpG-Island z.B. einer Promotorregion getroffen werden kann. Es wird heute davon ausgegangen, dass die CpG-Islands als eine Art epigenetischer Schalter fungieren, wobei eine Vielzahl an einzelnen CpGs zusammen einen „An“ oder „Aus“-Zustand aufrecht erhalten (Bock et al., 2008).

Die geschilderten Eigenschaften lassen die Bisulfit-Pyrosequenzierung als geeignete Methode zur quantitativen DNA-Methylierungs-Analyse mehrerer benachbarter Einzel-CpGs in FFPE-Tumormaterial erscheinen, weshalb diese Methode für die Durchführung der vorliegenden Arbeit gewählt wurde.

4.7 Probleme der Untersuchungen an FFPE-Tumorgewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE) Tumorgewebe mit einer Lagerungsdauer von bis zu zehn Jahren verwendet. FFPE-Material ist ein für molekularbiologische Fragestellungen oft verwendetes Untersuchungsmaterial, welches jedoch wesentliche Probleme bei der Durchführung vieler Methoden mit sich bringt. Im Gegensatz zu kryokonserviertem Tumorgewebe ist FFPE-Material leicht verfügbar, da Tumoren in der Regel eine histologische Beurteilung durch einen Pathologen erfahren und das restliche Gewebe danach in Paraffinblöcken viele Jahre aufbewahrt wird. Durch die Konservierung in Formalin werden die Zellen und auch die DNA angegriffen. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit von der konservierten Gewebemenge, Art und Länge der Fixierung zu Quervernetzungen, Strangbrüchen und zur Fragmentierung der DNA kommt (Van Dongen et al., 2003; Gilbert et al., 2007). Dieses bedeutet eine verminderte Qualität der DNA, die insbesondere bei der Durchführung einer PCR kritisch ist. Um die Qualität und Amplifikationsfähigkeit der DNA zu prüfen, wurde deshalb eine multiplex

Kontrollgen-PCR zur Bestimmung des Degradationsgrades durchgeführt (Van Dongen et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit zeigte die aus FFPE-Gewebe extrahierte DNA wie erwartet eine verminderte Qualität in der Kontrollgen-PCR. Zwei DNA-Proben wiesen eine so schlechte Qualität auf, dass kein PCR-Produkt generiert werden konnte und diese Proben deshalb von weiteren Analysen ausgeschlossen werden mussten. Die meisten DNA-Proben ($n = 14/26$) zeigten nur zwei PCR-Banden (100bp und 200bp) und keine DNA-Probe zeigte alle fünf PCR-Banden in der Kontrollgen-PCR.

Bei der Optimierung der Assays zeigten sich Unterschiede zwischen Kontrollen (Brustdrüsengewebe), Mammakarzinomzelllinien und dem FFPE-Tumorgewebe. Die PCR-Assays funktionierten meist problemlos an Kontrollen und Mammakarzinomzelllinien. Die Tumoren zeigten dagegen oft keine oder schwache PCR-Banden. In einem Assay (*FANCL*) konnte die PCR für das FFPE-Material nicht optimiert werden. Im *FANCB*-Assay konnten insgesamt nach drei Wiederholungen nur 18 von 26 Tumorproben ausgewertet werden.

Insgesamt zeigten die eigenen Untersuchungen, dass Pyrosequenzierungsanalysen von FFPE-Tumorgewebe schwierig durchzuführen sind und verschiedene Probleme auftreten können.

4.8 Weitere Probleme der Assay-Optimierung

Die Optimierung der Assays auf das Untersuchungsmaterial konnte nur für die Hälfte (7/14) der *BRCA*- und Fanconi Anämie-Gene erfolgreich durchgeführt werden. Im folgenden Abschnitt sollen Möglichkeiten, die diese Problematik erklären könnten, diskutiert werden.

Bei der Etablierung von PCR-Assays können durch die Basensequenz der zu untersuchenden DNA-Region Probleme auftreten. Dabei führen Sequenzwiederholungen, ein unausgeglichener GC-Gehalt und Haarnadelstrukturen in der Sekundärstruktur der Zielregion beispielsweise zu unspezifischen Annealing von Primern. Auch bei der Basensequenz der Primer kann es durch komplementäre Sequenzen zu Dimer- oder Sekundärstrukturen kommen, die eine spezifische Bindung verhindern können (Singh et al., 2000; Burpo, 2001). Diese Mechanismen können dazu führen, dass einige Regionen der Chromosomen aufgrund ihrer Sequenz nicht oder nur schlecht untersucht werden können (Burpo, 2001). Die

beschriebenen Probleme werden zusätzlich durch die Bisulfitkonversion der Bisulfit-Pyrosequenzierung verstärkt, da nach dieser Konversion nur noch drei statt vier Basen in der DNA-Sequenz vorkommen und somit Sequenzwiederholungen gehäuft auftreten können.

Bei der Optimierung von PCR-Assays werden im Wesentlichen die Salzkonzentrationen und die Annealingtemperatur verändert. Hierdurch können die PCR-Bedingungen in einem engen Rahmen verbessert werden. Durch eine niedrigere Annealingtemperatur oder die Erhöhung der Konzentration bestimmter Salze (z.B. MgCl) kann die Anzahl der DNA bindenden Primer erhöht werden. Gleichzeitig verliert die Hybridisierung dadurch jedoch an Spezifität (Burpo, 2001). Um die Spezifität zu kontrollieren, wurde in dieser Arbeit bei der Optimierung genomische DNA eingesetzt, welche nicht bisulfitkonvertiert vorlag und deshalb in den PCR-Assays keine PCR-Produkte gebildet werden sollten. Einige Assays konnten nicht weiter optimiert werden, da es zu unspezifischen PCR-Produkten kam und somit die Spezifität des Assays nicht gewährleistet werden konnte.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass die sieben Assays mit den verwendeten Primerpaaren mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Grund der Sequenz der Zielregion nicht funktionierten. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Assays für alle *BRCA*- und Fanconi Anämie-Gene auf das verwendete Untersuchungsmaterial zu optimieren. Der Schwerpunkt der Arbeit wurde jedoch auf die weitere Analyse der funktionierenden Assays gelegt. Es wurde deshalb darauf verzichtet, neue Primerpaare zu entwerfen, um mit diesen evtl. weitere Fanconi Anämie-Assays auswerten zu können.

4.8.1 DNA-Methylierung des *BRCA1*-Gens

Im *BRCA1*-Assay konnten nur einzelne Mammakarzinomzelllinien (5/8) ausgewertet werden. Die Kontrollen aus gesundem Brustdrüsengewebe und die primären Tumoren waren nicht auswertbar. Es bleibt fraglich, warum in diesem Assay die Mammakarzinomzelllinien scheinbar das am besten zu untersuchende Material war. Die Messwerte der Mammakarzinomzelllinien variierten sehr stark (4-86 %). Anhand der einzelnen Methylierungswerte kann man vermuten, dass *BRCA1* ein differentiell methyliertes Gen ist. Diese Beobachtung wird ebenfalls in der Literatur beschrieben. Es konnte in verschiedenen Tumorentitäten sowie auch beim familiären Mammakarzinom gezeigt werden, dass das

BRCA1-Gen durch eine DNA-Hypermethylierung supprimiert wird (Chan et al., 2002; Narayan et al., 2004; Lee et al., 2007; Bernal et al., 2008; Tapia et al., 2008; Wei et al., 2008).

Aufgrund der Literaturlage gilt *BRCA1* inzwischen als differentiell methyliertes Gen in verschiedenen Tumorentitäten, insbesondere beim Mammakarzinom. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen diese Beobachtung ansatzweise, sind aber insgesamt unzureichend, um eine zuverlässige Aussage treffen zu können.

4.8.2 Pyrosequenzierung und Sanger-Sequenzierung des *BRCA2-(FANCD1)* Gens

Die Bisulfit-Pyrosequenzierung des *BRCA2-(FANCD1)* Gens zeigte unspezifische Peaks in den Pyrogrammen, welche nicht mit technischen Problemen erklärt werden konnten. Es wurde versucht, mit einer Sanger-Sequenzierung die Herkunft der unspezifischen Peaks zu klären. Die Durchführung der Sanger-Sequenzierung war mit verschiedenen Problemen verbunden. Alle Sequenzen zeigten nach einer Mononukleotidwiederholung von zehn A/T-Basen ein Hintergrundrauschen. Die Sequenzen konnten deshalb nur jeweils von einer Seite bis zu dieser Position analysiert werden. Es konnten in den Sequenzierungen keine Gründe (z.B. Annotationsfehler) für die unspezifischen Peaks gefunden werden.

Das Hintergrundrauschen der Sanger-Sequenzierung wurde vermutlich durch ein Verrutschen des Schreibrasters an der Position der Mononukleotidwiederholung verursacht. Dabei kommt es bei der Synthese des komplementären DNA-Einzelstrangs durch die Taq-Polymerase zu einem Überspringen eines wiederholten Nukleotids. Das Auftreten solcher Rasterverschiebungen wurde in der Literatur oft nach Mononukleotidwiederholungen mit einer Länge von >9-10 Nukleotiden beobachtet (Clarke et al., 2001; Shinde et al., 2003; Fazekas et al., 2010).

Durch die Sanger-Sequenzierung konnten die unspezifischen Peaks der Pyrosequenzierung des *BRCA2-(FANCD1)* Gens nicht aufgeklärt werden, so dass diese vermutlich auch mit dem beobachteten Phänomen der Mononukleotidwiederholung zu erklären sind. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit wurde auf die Erstellung neuer Assays für das *BRCA2-(FANCD1)* Gen verzichtet.

4.9 Ergebnisse der Assays ohne differentielle DNA-Methylierung

Durch die Voruntersuchungen an Mammakarzinomzelllinien und einzelnen Tumoren konnten fünf von sieben Fanconi Anämie-Genen identifiziert werden, welche keine differentielle DNA-Methylierung der untersuchten regulatorischen Region aufwiesen. In drei dieser Assays traten in einigen Proben einzelne schwach hypermethylierte CpGs auf, welche aber höchstwahrscheinlich keine funktionelle Relevanz besitzen (siehe Kap. 4.9.1). Für zwei der nicht-differentiell methylierten Gene (*FANCC* und *FANCN (PALB2)*) existieren publizierte Daten, welche ein verändertes Methylierungsmuster beim Mammakarzinom beschreiben (Potapova et al., 2008; Sinha et al., 2008). Im Folgenden soll auf die Bedeutung einzelner hypermethylierter CpGs in diesen Genen eingegangen werden sowie die vorliegenden Ergebnisse und die Literatur diskutiert werden.

4.9.1 Bedeutung einzelner differentiell methylierter CpGs

In der vorliegenden Arbeit wurden in drei Assays (*FANCC*, *FANCL*, *FANCN*) einzelne CpGs detektiert, die eine schwache Hypermethylierung aufwiesen. Es wurden in diesen Genen zwischen fünf und zehn Einzel-CpGs analysiert, wobei die Nachbar-CpGs bei allen Proben ein unauffälliges Methylierungsmuster zeigten. Die DNA-Methylierung aller drei Gene war sehr niedrig und die hypermethylierten CpGs wiesen eine nur wenige Prozentpunkte (max. 4,5) höhere Methylierung auf als der Mittelwert der DNA-Methylierung der Kontrollen.

Bock et al. (2008) gehen davon aus, dass der Zustand eines CpG-Islands durch das Zusammenspiel multipler Einzel-CpGs bestimmt wird. Dieses geht einher mit der Beobachtung, dass in Karzinomen ganze CpG-Islands aberrant methyliert vorliegen (Bock et al., 2008). Der Methylierungsgrad eines Einzel-CpGs spielt demnach eine nur geringe Rolle für die Expression eines Gens. Es ist daher höchst unwahrscheinlich, dass es sich bei den hypermethylierten CpGs um tumor-assoziierte Veränderungen handelt. Der Ausschluss dieser Assays von den weiteren Untersuchungen erscheint aus diesem Grunde gerechtfertigt.

In der Promotorregion des *FANCA*- und *FANCB*-Gens wurden insgesamt sechs bzw. elf CpGs untersucht und die einzelnen CpGs zeigten ein homogenes Methylierungsmuster. Es ist davon auszugehen, dass durch die Anzahl der beurteilten CpGs eine realistische Aussage über das CpG-Island und den Aktivitätszustand des Promotors dieser Gene getroffen werden kann.

4.9.2 DNA-Methylierung des *FANCC*-Gens

Das *FANCC*-Gen zeigte in den Voruntersuchungen zur Auswahl differentiell methylierter Gene ein unauffälliges Methylierungsmuster der untersuchten Region und wurde deshalb nicht weiter untersucht. Eine Studie zum „early-onset“ und „late-onset“ Mammakarzinom fand in 30-39 % der Proben (n=106) und einer Mammakarzinomzelllinie eine DNA-Hypermethylierung der Promotorregion von *FANCC* und zudem auch eine verminderte Expression dieses Gens (Sinha et al., 2008). In den vorliegenden Untersuchungen konnte in keiner der acht Zelllinien und keiner der drei Tumorproben eine auffällige DNA-Methylierung gefunden werden. Es wurde im Gegensatz zu Sinha et al. (2008) mit dem *FANCC*-Assay nicht die Promotorregion des *FANCC*-Gens untersucht, sondern ein Intron des Gens. Dieses könnte die Ursache dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit keine DNA-Hypermethylierung beobachtet werden konnte.

4.9.3 DNA-Methylierung des *FANCN*- (*PALB2*) Gens

Das *FANCN*- (*PALB2*) Gen ist eines der drei Fanconi Anämie-Gene, bei welchem ein Zusammenhang von Keimbahnmutationen dieses Gens mit dem familiären Mammakarzinom nachgewiesen wurde (Rahman et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit fand sich trotz der Bedeutung des *FANCN*- (*PALB2*) Gens für das familiäre Mammakarzinom in zwei auswertbaren Tumoren und acht Mammakarzinomzelllinien keine auffällige DNA-Methylierung der untersuchten Region. In einer Studie von Potapova et al. (2008) konnte eine Hypermethylierung derselben Region des *FANCN*-Gens in sporadischen und familiären Mamma- und Ovarialkarzinomen gezeigt werden. Dabei trat die DNA-Hypermethylierung in zwei von acht familiären Mammakarzinomen auf und bei den sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen in vier von 60 bzw. vier von 53 analysierten Tumoren. Die Autoren vermuten, dass die Hypermethylierung des *FANCN*- (*PALB2*) Gens eine häufigere Veränderung darstellt, als Keimbahnmutationen dieses Gens. In der gleichen Studie wurden zusätzlich vier Mammakarzinomzelllinien untersucht, welche ein unauffälliges Methylierungsmuster zeigten. Zwei der Mammakarzinomzelllinien (MDAMB231 und T47D) wurden auch in der vorliegenden Arbeit untersucht und wiesen ebenfalls ein unauffälliges Methylierungsmuster auf. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen und den Erkenntnissen von Potapova et al. (2008) ist anzunehmen, dass *FANCN*- (*PALB2*) ein in Mammakarzinomzelllinien eher selten durch DNA-Methylierung supprimiertes Gen ist. Ob eine Hypermethylierung des Gens beim Mammakarzinom mit der beschriebenen Frequenz auftritt und

somit häufiger vorkommt als Keimbahnmutationen des *FANCN-* (*PALB2*) Gens, bleibt angesichts der kleinen Fallzahlen von Potapova et al. (2008) fraglich. Die vorliegenden Ergebnisse können ein häufiges Auftreten von Hypermethylierung in diesem Gen nicht bestätigen.

4.9.4 DNA-Methylierung des *FANCD2-*, *FANCL-* und *FANCI-* (*BRIP1*) Gens

Die drei Fanconi Anämie-Gene *FANCD2-*, *FANCL-* und *FANCI-* (*BRIP1*) zeigten in den untersuchten Mammakarzinomzelllinien und Tumoren kein gegenüber dem normalen Brustdrüsengewebe verändertes Methylierungsmuster der untersuchten Promotorregionen. Zu diesen Genen liegen keine publizierten Daten (Stand: August 2012) zu Veränderungen des Methylierungsmusters beim Mammakarzinom vor. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass epigenetische Veränderungen dieser Gene bei der Entstehung des familiären Mammakarzinoms keine Rolle spielen.

4.10 Differentielle DNA-Methylierung des *FANCA-* und *FANCB-*Gens

4.10.1 Methylierung des *FANCA-*Gens in Tumoren

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten gegenüber den gewebespezifischen Kontrollen (gesundes Brustdrüsengewebe) in 41,7 % der ausgewerteten Tumoren eine Hypomethylierung der Promotorregion des *FANCA-*Gens. Vier von fünf *BRCA1-*positiven Tumoren waren hypomethyliert. Bei der *BRCA1-*Mutation des Tumors, der eine normale DNA-Methylierung zeigte, handelte es sich im Gegensatz zu den anderen um eine Splice-Site-Mutation. Diese Mutation führt dazu, dass ein unvollständiges *BRCA1-*Protein gebildet wird, dessen Funktion nur eingeschränkt, aber nicht wie bei den anderen Mutationen vollkommen aufgehoben ist (Williams et al., 2004). Die Art der Mutation des *BRCA1-*Gens könnte ein Grund für den beobachteten Unterschied in der DNA-Methylierung des Gens sein, wobei diesbezüglich weiterführende Untersuchungen notwendig wären.

Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse lassen vermuten, dass DNA-Hypomethylierung der untersuchten Promotorregion des *FANCA-*Gens eine charakteristische Veränderung beim familiären Mammakarzinom darstellt. Mutationen des *FANCA-*Gens konnten bisher in einzelnen Fällen beobachtet werden, wobei ein starker Zusammenhang mit der Entstehung von familiären Mammakarzinomen nicht gezeigt werden konnte (Seal et al., 2003; Haiman et al., 2008; Solyom et al., 2011). Veränderte DNA-Methylierung konnte dagegen in keiner

Studie gezeigt werden (Stand: August 2012), so dass die vorliegenden Ergebnisse die erste Beobachtung von Veränderungen des Methylierungsmusters in diesem Gen darstellen.

Das *FANCA*-Gen ist ein Tumorsuppressor-Gen. Ein Tumor profitiert in diesem Zusammenhang von einer verminderten Expression eines Tumorsuppressor-Gens. Eine Hypomethylierung würde jedoch am ehesten zu einer Aktivierung und vermehrten Expression dieses Gens führen. In der Literatur sind für die Promotorregionen von Tumorsuppressor-Genen hauptsächlich DNA-Hypermethylierungen beschrieben (Cheung et al., 2009). Das steht im Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen, wonach die Promotorregion des *FANCA*-Gens beim familiären Mammakarzinom eher hypomethyliert zu sein scheint. Die Hypomethylierung des *FANCA* Promotors könnte im Rahmen des Fanconi-Anämie-Pathways eine Kompensation für den Ausfall anderer Fanconi Anämie-Gene darstellen. Der Ausfall eines anderen Fanconi Anämie-Proteins könnte dabei durch Überexpression des *FANCA* Gens teilweise ausgeglichen werden, um die Funktion des Pathways aufrecht zu erhalten.

Letztendlich wäre es wichtig, eine Expressionsanalyse des *FANCA*-Gens durchzuführen, um zu klären, ob es durch die Hypomethylierung der Promotorregion zu einer vermehrten Expression von *FANCA* kommt. Diese Untersuchungen wurden im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

In einer Arbeit aus dem Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, über die DNA-Methylierung der Fanconi Anämie-Gene in Larynxkarzinomen und Larynxkarzinomzelllinien, konnte in der untersuchten Region des *FANCA*-Gens ebenfalls eine Hypomethylierung gefunden werden, die mit der Entstehung des Larynxkarzinoms assoziiert zu sein scheint (Szaumkessel et al., 2011). Zudem wurde auch im Tumorsuppressor-Gen *BRCA1* eine Hypomethylierung der Promotorregion in Larynxkarzinomzelllinien und primären Larynxkarzinomen identifiziert. Diese Beobachtungen unterstützen den Verdacht, dass eine Hypomethylierung des *FANCA*-Gens eine charakteristische Veränderung bei der Entstehung einiger Karzinome sein könnte.

Röhrs et al. (2009) fanden bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) ebenfalls Tumorsuppressor-Gene, welche durch DNA-Hypomethylierung der Promotorregion konstitutiv aktiviert wurden. Die DNA-Hypomethylierung wurde nur bei einer Subgruppe von AML-

Zelllinien beobachtet, die Mutationen im *MLL*-Gen trugen. Die Autoren dieser Arbeit nehmen an, dass das mutierte *MML*-Gen als starkes Onkogen die Effekte der Desinhibition der Tumor-Suppressor-Gene überdecken kann.

In Ovarialkarzinomen konnte eine Hypomethylierung des *BRCA2-(FANCD1)* Gens in fortgeschrittenen Stadien beobachtet werden, die mit einer vermehrten Expression des Gens einhergingen (Chan et al., 2002). Eine weitere Studie zeigte vereinzelt eine Hypomethylierung des *FANCF*-Gens in fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen, die mit einer Cisplatin-resistenz verbunden war (Taniguchi et al., 2003). D'Andrea (2003) vermutet, dass Tumoren durch eine transiente Inaktivierung wichtiger Pathways einen maligneren Phänotyp ausprägen können, wenn deren Funktion im Rahmen der Karzinogenese in fortgeschrittenen Stadien wiedergewonnen werden kann. Im Frühstadium profitiert ein Tumor durch chromosomale Instabilität und hohe Mutationsraten, spricht gleichzeitig aber sehr sensibel auf Chemotherapeutika an. Im fortgeschrittenen Stadium kann eine Krebszelle durch die Restaurierung von DNA-Reparatur-Pathways wieder chromosomale Stabilität gewinnen, was zu einem stabileren Phänotyp und zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika beitragen kann.

Abschließend bleibt die Bedeutung der beobachteten DNA-Hypomethylierung des *FANCA*-Gens vorerst unklar. In der Literatur ist eine Hypomethylierung des *FANCA*-Gens und anderer Tumorsuppressor-Gene beschrieben, die als charakteristische Merkmale einiger Tumoren angesehen werden. Die Untersuchungen des Tumorgewebes lassen vermuten, dass eine DNA-Hypomethylierung des *FANCA*-Gens beim familiären Mammakarzinom eine Rolle spielt und die Assoziation dieser Veränderungen mit der Entstehung familiärer Mammakarzinome charakteristisch für diese Tumoren ist. Es bedarf weiterer Analysen des *FANCA*-Gens und des Fanconi-Anämie-Pathways, um die ursächlichen molekularen Mechanismen aufzuklären.

4.10.2 Methylierung des *FANCA*-Gens in Mammakarzinomzelllinien

Im *FANCA*-Assay zeigten vier von acht (50 %) Mammakarzinomzelllinien eine Hypomethylierung des Promotorbereichs des *FANCA*-Gens. Eine Mammakarzinomzelllinie (HCC 1937) war hypermethyliert. Alle hypomethylierten Zelllinien zeigten einen geringeren Methylierungsgrad als die untersuchten Tumoren. Die Zelllinien zeigten somit im Vergleich zu den Tumoren eine deutlichere Ausprägung des Grades der Hypomethylierung und bestätigen die am Tumorgewebe erhobenen Ergebnisse. Die stärkere Ausprägung der

Hypomethylierung liegt vermutlich an der Akkumulation von Aberrationen in Zelllinien und einem höheren Tumorzellgehalt im Vergleich zu den Tumoren. Die Untersuchungen der Mammakarzinomzelllinien lassen vermuten, dass es durch eine Hypermethylierung des *FANCA*-Gens zu einer Inaktivierung dieses Gens im Rahmen der Karzinogenese kommen könnte. Diese Beobachtung konnte in den 24 auswertbaren Tumoren familiärer Mammakarzinome nicht bestätigt werden.

4.10.3 Methylierung des *FANCB*-Gens in Tumoren

Im *FANCB*-Assay zeigten acht von 18 Tumoren (44,4 %) eine Hypomethylierung und acht Tumoren (44,4 %) eine Hypermethylierung gegenüber den gewebespezifischen Kontrollen. Interessanterweise wiesen drei von vier Tumoren von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen eine Hypermethylierung des *FANCB*-Gens auf. Der vierte *BRCA1* positive Tumor wies, wie in *FANCA* diskutiert, im Gegensatz zu den anderen Tumoren eine Splice-Site-Mutation auf. Es stellt sich die Frage, ob die DNA-Hypermethylierung des *FANCB*-Gens eine für die *BRCA1* positiven Tumoren besonders typische Veränderung darstellt.

Bisher (Stand: August 2012) konnte noch keine Studie Mutationen oder ein differentielles Methylierungsmuster des *FANCB*-Gens beim Mammakarzinom zeigen. Für Kopf-Hals-Karzinomen dagegen wurde eine Hypermethylierung des *FANCB*-Gens beobachtet, die mit der Entstehung dieser Karzinome assoziiert war (García et al., 2009; Smith et al., 2010).

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die Suppression der Genaktivität durch Hypermethylierung des Promotorbereichs für das *FANCB*-Gen ein charakteristischer Mechanismus bei der Entstehung und/oder Progression des familiären Mammakarzinoms ist. Durch den (teilweisen) Ausfall des Fanconi-DNA-Reparatur-Pathways könnte es zur Anreicherung von Mutationen kommen, welche die weitere Progression des Tumors ermöglicht. Dieses könnte, ähnlich wie die Keimbahnmutationen des *BRCA2*-Gens, ein Mechanismus der Karzinogenese des familiären Mammakarzinoms sein. Diese Überlegung steht im Einklang mit der Studie von Cucer et al. (2008), wonach DNA-Hypermethylierung des *BRCA2*-Gens mit der Entstehung des sporadischen Mammakarzinoms assoziiert ist. Da *FANCB* und *BRCA2* im Fanconi-Anämie-Pathway eine wichtige Rolle spielen, ist es durchaus naheliegend und wird durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt, dass nicht nur das *BRCA2*-Gen, sondern auch das *FANCB*-Gen eine Rolle bei der Entstehung des familiären Mammakarzinoms spielt.

Das *FANCB*-Gen ist das einzige der Fanconi Anämie-Gene, welches auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Es erfährt daher eine geschlechtsspezifische Methylierung, welches im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnte (Meetei et al., 2004; Szaumkessel et al., 2011). Durch den Mechanismus der DNA-Methylierung liegt in jeder Zelle nur eine aktive Kopie des *FANCB*-Gens vor, so dass angenommen wird, dass das *FANCB*-Gen eine besonders sensible Komponente des Fanconi-Anämie-Pathways darstellt (Meetei et al., 2004). Dieses könnte erklären, warum *FANCB* von den Fanconi Anämie-Genen neben *BRCA2 (FANCD1)* die größte Bedeutung bei der Entstehung des familiären Mammakarzinoms zukommen könnte.

Die beobachtete Hypomethylierung der Promotorregion von *FANCB* in acht von 18 Tumorproben lässt sich ähnlich wie in *FANCA* nur schwer deuten. Taniguchi et al. (2003) beschreiben eine Hyper- und Hypomethylierung des *FANCF*-Gens in Zelllinien aus Ovarialkarzinomen. Die Autoren vermuten, dass es im Rahmen der Tumorprogression zunächst zu einer Hypermethylierung der Promotorregion und damit verbunden zu einer verstärkten Sensibilität auf Chemotherapeutika wie Cisplatin kommt. In späteren Stadien kommt es bei einigen Tumorzellen wieder zu einer Demethylierung des *FANCF*-Gens, welche mit einer Cisplatinresistenz einhergeht (Taniguchi et al., 2003). Die vorliegenden Untersuchungen an Mammakarzinomen lassen keine Abhängigkeit der DNA-Methylierung vom Grading oder Staging erkennen. Der Probenumfang ist mit 18 auswertbaren Tumoren im *FANCB*-Assay aber vermutlich zu gering, um eine gewichtige Aussage treffen zu können.

Wie schon beim *FANCA*-Gen diskutiert, könnte die transiente Inaktivierung des Fanconi-Anämie-Pathways zunächst durch eine hohe chromosomale Instabilität die Progression des Tumors fördern. Im fortgeschrittenen Stadium dagegen könnte die Re-Aktivierung des Pathways wieder zu einer chromosomalen Stabilisierung führen, die die Krebszellen gegen äußere Faktoren schützt (D'Andrea, 2003). Die transiente Inaktivierung des Pathways könnte durch diesen Mechanismus einen maligneren Phänotyp des Mammakarzinoms hervorrufen. Diese Vermutung wird auch durch eine Arbeit zum Ovarialkarzinom gestützt, bei welcher eine Hypomethylierung des *BRCA2-(FANCD1)* Gens gefunden wurde, die mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium korrelierte (Chan et al., 2002).

Die eigenen Untersuchungen lassen vermuten, dass eine DNA-Hyper- und Hypomethylierung der Promotorregion des *FANCB*-Gens mit dem familiären Mammakarzinom assoziiert ist und wahrscheinlich eine charakteristische Veränderung der untersuchten Tumoren darstellt.

4.10.4 Methylierung des *FANCB*-Gens in Mammakarzinomzelllinien

Das *FANCB*-Gen zeigte in sechs von acht (75 %) untersuchten Mammakarzinomzelllinien eine Hypomethylierung der Promotorregion des *FANCB*-Gens. Die DNA-Methylierung war in fünf dieser Zelllinien sehr stark vermindert (1-4 %), wobei dieses vermutlich durch einen höheren Tumorzellgehalt und die für Zelllinien typischen Extremwerte zu erklären ist.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Mammakarzinomzelllinien unterstützen die Vermutung, dass eine Hypomethylierung der Promotorregion des *FANCB*-Gens eine charakteristische Veränderung von Mammakarzinomen darstellt.

4.10.5 Methylierung des *FANCA*-Gens und *FANCB*-Gens im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen

Im *FANCA*-Gen zeigten 5 von 22 analysierten Blutproben eine auffällige DNA-Methylierung der Promotorregion im Vergleich zu den gewebespezifischen Kontrollen. Vier der zugehörigen Tumoren zeigten eine DNA-Hypomethylierung des *FANCA*-Gens. Auch im *FANCB*-Gen traten in zwei von 16 Blutproben von Mammakarzinompatientinnen gegenüber Blutproben von gesunden Probanden auffällige Methylierungsmuster auf. Die DNA einer Blutprobe einer Patientin (P21) war leicht hypomethyliert (21 %) und der zugehörige Tumor zeigte ebenfalls eine Hypomethylierung (18 %). Eine weitere Blutprobe (P26) war dagegen sehr stark hypermethyliert (88 %). Das Tumorgewebe dieser Patientin wies mit 41 % ebenfalls eine leichte Hypermethylierung auf.

Es ist fraglich, ob die in *FANCA* und *FANCB* in einzelnen Proben auftretenden Veränderungen der DNA-Methylierung des Blutes im Rahmen des familiären Mammakarzinoms bzw. im Rahmen konstitutioneller Veränderungen zu deuten sind. In *FANCA* war die Hypermethylierung im Vergleich zu den Kontrollen nur sehr gering ausgeprägt, so dass eine größere Bedeutung unwahrscheinlich ist. In *FANCB* fanden sich Veränderungen nur in zwei Proben, so dass auch hier die Bedeutung im Rahmen des familiären Mammakarzinoms unklar bleibt. Letztendlich sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um diese Frage genauer beantworten zu können.

Im *BRCA1*-Gen wurde in einer Arbeit vereinzelt (n = 3) eine Hypermethylierung im Blut, Mundschleimhautzellen und Tumoren *BRCA1*-negativer Mammakarzinompatientinnen

detektiert (Snell et al., 2008). Diese Daten lassen vermuten, dass epigenetische Mechanismen auch beim hereditären Mammakarzinom als konstitutionelle Veränderung eine Rolle spielen könnten.

Die Mechanismen der Vererbung epigenetischer Modifikationen sind bisher nur unzureichend verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurde der konstitutionelle Methylierungsgrad des *FANCA*- und *FANCB*-Gens durch Bestimmung der DNA-Methylierung im peripheren Blut von Mammakarzinom-Patientinnen bestimmt. Letztlich ist fraglich, inwiefern der Methylierungsgrad des peripheren Blutes die konstitutionelle DNA-Methylierung dieser Gene zuverlässig widerspiegelt. Im Zusammenhang mit konstitutionellen Veränderungen treten bestimmte Methylierungsmuster in verschiedenen somatischen Geweben (Blut, Mundschleimhautzellen, Haarfollikelzellen etc.) auf und wurden in Zusammenhang mit dem hereditären Dickdarmkrebs häufig untersucht (Hitchins and Ward, 2009). Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit wurden nur Untersuchungen am peripheren Blut durchgeführt, um einen Anhalt für den konstitutionellen Methylierungsgrad zu erhalten. Um den konstitutionellen Methylierungsgrad der untersuchten Gene sicher zu bestimmen, müssten weitere Gewebe untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit trat eine differente DNA-Methylierung der untersuchten Gene überwiegend im Tumorgewebe auf, während nur einzelne Patientinnen auch auffällige Werte im Blut zeigten. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der beschriebenen Hypo- und Hypermethylierung des *FANCA*- und *FANCB*-Gens im Wesentlichen um Veränderungen im Tumorgewebe handelt, welche wahrscheinlich nur eine geringe oder keine Bedeutung im Sinne einer konstitutionell veränderten DNA-Methylierung besitzen.

4.10.6 Einfluss des Tumorzellgehalts in Paraffinschnitten auf die gemessene DNA-Methylierung

Die DNA des in dieser Arbeit verwendeten Tumorgewebes wurde zusammen mit seinem Umgebungsgewebe extrahiert, dessen Methylierungsgrad in die Analysen mit einging. Durch die Zellen des Umgebungsgewebes werden die Ergebnisse der Methylierungsanalyse des Tumorgewebes verfälscht (Potapova et al., 2008). Um diesen Faktor kontrollieren zu können, wurde der Tumorzellgehalt der Proben bestimmt und mit dem Methylierungsgrad verglichen. Es zeigte sich jedoch insgesamt keine deutliche Verschiebung der Methylierungswerte in Abhängigkeit vom Tumorzellgehalt. Dies könnte sich dadurch erklären, dass im umgebenden

Fettgewebe weniger kernhaltige Zellen zu finden sind und somit im Verhältnis nur wenig DNA mit extrahiert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte für das *FANCA*- und *FANCB*-Gen keine Abhängigkeit des Methylierungsgrades vom Tumorzellgehalt der untersuchten Proben gezeigt werden. Bei höherem Tumorzellgehalt fanden sich zwar tendenziell extremere (Hypo-/Hyper-) Methylierungswerte, aber auch in der Gruppe mit niedrigem Tumorzellgehalt zeigten viele Proben einen deutlich veränderten Methylierungsstatus. Ein Problem der Darstellung der DNA-Methylierung in Abhängigkeit des Tumorgehalts war die geringe Anzahl der Proben (*FANCA* n = 24, *FANCB* n = 18).

In Mammakarzinomzelllinien kann von einem hohen Tumorzellgehalt (~100 %) ausgegangen werden. In der vorliegenden Arbeit sollten folglich bei den Mammakarzinomzelllinien die deutlichsten Abweichungen vom Methylierungsgrad der gewebespezifischen Kontrolle gemessen werden. Im *FANCA*-Assay zeigten alle Mammakarzinomzelllinien mit 8-19 % (MW = 13 % STABW = 4,4) eine deutliche Hypomethylierung. Eine einzelne Mammakarzinomzelllinie war hypermethyliert (HCC1937), wohingegen unter den primären Tumoren keine Hypermethylierung gemessen wurde. Im *FANCB*-Gen zeigten fünf der sechs hypomethylierten Zelllinien eine deutliche Hypomethylierung (1-4 % MW = 2 % STABW = 0,9) und nur drei von neun hypomethylierten primären Tumorproben wiesen ähnlich niedrige Methylierungsgrade auf (P15 (0 %), P2 (1 %), P19 (4 %)). Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass Karzinomzelllinien generell stärker veränderte DNA-Methylierungswerte zeigen als Primärtumoren, da sie i. d. R. selektiven Wachstumsbedingungen unterliegen (siehe Kap. 4.4) (Paz et al., 2003). Die Untersuchung der Mammakarzinomzelllinien zeigte Veränderungen der DNA-Methylierung des *FANCA* und *FANCB*-Gens, die analog auch in den untersuchten Tumoren beobachtet werden konnten. Insgesamt muss man annehmen, dass durch den unterschiedlichen Tumorzellgehalt der Proben die Methylierungswerte der Tumorzellen der Mammakarzinom-Patientinnen nur näherungsweise bestimmt werden konnten.

4.11 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden für zwei von sieben analysierten Fanconi Anämie-Gene, *FANCA* und *FANCB*, bei familiären Mammakarzinomen vom gesunden Brustdrüsengewebe

abweichende Methylierungsmuster gefunden. Um die funktionelle Bedeutung der DNA-Hyper- und Hypomethylierung des *FANCA*- und *FANCB*-Gens weiter abzuklären, müssten Expressionsanalysen durchgeführt werden, um die Aktivität der Gene in Abhängigkeit der DNA-Methylierung beurteilen zu können

Im Blut der untersuchten Patientinnen fand sich bei einzelnen Proben ein von Blutproben gesunder Frauen abweichendes Methylierungsmuster. Weiterführende Untersuchungen sollten klären, ob dieses Methylierungsmuster in anderen Geweben und auch bei anderen Familienangehörigen zu finden ist und ob diese Veränderungen mit der Entstehung familiärer Mammakarzinome assoziiert sind.

Des Weiteren traten in der vorliegenden Arbeit Veränderungen der DNA-Methylierung der Gene *FANCA* und *FANCB* in Mammakarzinomzelllinien auf, die z.T. von Mammakarzinomen ohne bekannte *BRCA1/2* Mutation stammen. Es bleibt zu klären, ob auch bei den Tumoren von Mammakarzinomen ohne Mutation bzw. familiäre Disposition die Veränderung des Methylierungsgrades der untersuchten Promotorregionen des *FANCA*- und *FANCB*-Gens ein häufiges Ereignis darstellt.

In dieser Arbeit stand ein relativ kleines Kollektiv an familiären Mammakarzinomen zur Verfügung. Größere Studien (evtl. an sporadischen Mammakarzinomen) könnten genauere Aussagen über die Häufigkeit und Bedeutung der gefundenen differentiellen Methylierung des *FANCA*- und *FANCB*-Gens treffen und evtl. auch eine Korrelation dieser Veränderungen mit klinischen Daten wie Erkrankungsalter oder Prognose der Erkrankung finden. Interessant wäre außerdem zu prüfen, ob eine Hypomethylierung dieser beiden Gene zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und in Folge dessen zu einer schlechteren Prognose für die Patientinnen führen könnte (Röhrs et al., 2009).

Abschließend konnten im Rahmen dieser Arbeit nur sieben der 15 Fanconi Anämie-Gene ausgewertet werden. In Zukunft wäre es wünschenswert, mit neuen Assays auch die DNA-Methylierung der anderen Fanconi Anämie-Gene zu bestimmen und somit einen Überblick über den gesamten Fanconi-Anämie-Pathway zu bekommen.

5 Zusammenfassung

Im Laufe des Lebens erkrankt in Deutschland etwa jede achte bis zehnte Frau an einem Mammakarzinom. Etwa 10 % dieser Erkrankungsfälle stellen dabei hereditäre Mammakarzinome dar. Mit *BRCA1*- und dem Fanconi Anämie-Gen *BRCA2 (FANCD1)* sind zwei Gene bekannt, deren Keimbahnmutation einen Großteil der bekannten hereditären Mammakarzinome ausmacht. Trotzdem sind ca. die Hälfte der genetischen Ursachen des familiären Mammakarzinoms nicht bekannt.

Neben Genmutationen können auch epigenetische Veränderungen, z.B. die Methylierung der DNA die Expression von Genen beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Bisulfit-Pyrosequenzierung das DNA-Methylierungsmuster regulatorischer Regionen von *BRCA*- und den Fanconi Anämie-Genen untersucht, um zu klären, ob es einen Zusammenhang zwischen epigenetischen Veränderungen dieser Gene und dem familiären Mammakarzinom gibt. Das Untersuchungskollektiv bestand aus 26 familiären Mammakarzinomproben und acht Mammakarzinomzelllinien. Das Tumorgewebe der untersuchten Mammakarzinome lag in Form von Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe vor. Als Kontrolle der DNA-Methylierung des Tumorgewebes wurde gesundes kryokonserviertes Brustdrüsengewebe verwendet. Zusätzlich wurde das Methylierungsmuster des Blutes der Mammakarzinom-Patientinnen untersucht, um die konstitutionelle DNA-Methylierung dieser Gene zu bestimmen.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit sieben der 13 untersuchten Fanconi Anämie-Gene erfolgreich analysiert und ausgewertet werden. Es konnte gezeigt werden, dass fünf der Fanconi Anämie-Gene (*FANCC*, *FANCD2*, *FANCL*, *FANCI (BRIP1)* und *FANCF (PALB2)*) kein gegenüber gesundem Brustdrüsengewebe verändertes Methylierungsmuster in den untersuchten familiären Mammakarzinomen und Mammakarzinomzelllinien aufwiesen. Mit *FANCA* und *FANCB* konnten in der vorliegenden Arbeit zwei Fanconi Anämie-Gene identifiziert werden, die ein differentielles DNA-Methylierungsmuster in familiären Mammakarzinomen aufweisen. Das *FANCA*-Gen wies in 10 von 24 (41,7 %) der untersuchten Tumoren und vier von acht (50 %) Mammakarzinomzelllinien eine

Hypomethylierung der Promotorregion auf. Eine von acht Mammakarzinomzelllinien (12,5 %) wies eine Hypermethylierung auf. Für das *FANCB*-Gen zeigten acht von 18 (44,4 %) der Tumoren eine Hypermethylierung der untersuchten Promotorregion. Acht der 18 (44,4 %) Tumoren und 75 % der Mammakarzinomzelllinien wiesen dagegen eine Hypomethylierung auf. Im Blut der untersuchten Patientinnen konnte vereinzelt ein im Vergleich zu gesunden Probanden verändertes Methylierungsmuster der Promotorregion des *FANCA*- und *FANCB*-Gens beobachtet werden. Eine Korrelation dieser Methylierungsunterschiede mit den Methylierungsdaten der entsprechenden Tumoren konnte nicht belegt werden.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit Veränderungen des Methylierungsmusters der Fanconi Anämie-Gene *FANCA* und *FANCB* beobachtet werden, die bei der Entstehung und/oder Progression des familiären Mammakarzinoms eine wichtige Rolle spielen könnten. In Zukunft sollte an Hand weiterer Untersuchungen die funktionelle Bedeutung der epigenetischen Veränderungen dieser beiden Gene näher untersucht werden, um zu klären, inwieweit ein verändertes Methylierungsmuster als zusätzlicher prognostischer Marker verwendet werden kann.

6 Literaturverzeichnis

Cancer Cell Line Project, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/CellLines/>.

Ammerpohl O, Martín-Subero J, Richter J, Vater I, Siebert R. 2009. Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation. *BBA-General Subjects* 1790(9):847-862.

Antequera F, Boyes J, Bird A. 1990. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62(3):503-514.

Antoniou A, Easton D. 2006. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25(43):5898-5905.

Antoniou A, Pharoah P, Narod S, Risch H, Eyfjord J, Hopper J, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg Å. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics* 72(5):1117-1130.

Auerbach A. 2009. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 668(1-2):4-10.

Bernal C, Vargas M, Ossandón F, Santibáñez E, Urrutia J, Luengo V, Zavala L, Backhouse C, Palma M, Argandoña J. 2008. DNA methylation profile in diffuse type gastric cancer: evidence for hypermethylation of the BRCA1 promoter region in early-onset gastric carcinogenesis. *Biological Research* 41:303-315.

Bertram J. 2000. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 21(6):167-223.

Bhaumik S, Smith E, Shilatifard A. 2007. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nature Structural & Molecular Biology* 14(11):1008-1016.

Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16(1):6-21.

Bock C, Walter J, Paulsen M, Lengauer T. 2008. Inter-individual variation of DNA methylation and its implications for large-scale epigenome mapping. *Nucleic Acids Research* 36(10):e55.

Burpo F. 2001. A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. *Biochemistry* 218:1-11.

Cailleau R, Olivé M, Cruciger Q. 1978. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 14(11):911-915.

Chan K, Ozçelik H, Cheung A, Ngan H, Khoo U. 2002. Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Research* 62(14):4151.

- Chan T, Yuen S, Kong C, Chan Y, Chan A, Ng W, Tsui W, Lo M, Tam W, Li V. 2006. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature* 200:6.
- Chen Y, Farmer A, Chen C, Jones D, Chen P, Lee W. 1996. BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Research* 56(14):3168.
- Cheung H, Lee T, Rennert O, Chan W. 2009. DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 87(4):335-350.
- Clarke L, Rebelo C, Goncalves J, Boavida M, Jordan P. 2001. PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Molecular Pathology* 54(5):351.
- Colella S, Shen L, Baggerly K, Issa J, Krahe R. 2003. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 35(1):146.
- Crépin M, Dieu M-C, Lejeune S, Escande F, Boidin D, Porchet N, Morin G, Manouvrier S, Mathieu M, Buisine M-P. 2012. Evidence of constitutional MLH1 epimutation associated to transgenerational inheritance of cancer susceptibility. *Human Mutation* 33(1):180-188.
- Cucer N, Taheri S, Ok E, Ozkul Y. 2008. Methylation status of CpG islands at sites- 59 to+ 96 in exon 1 of the BRCA2 gene varies in mammary tissue among women with sporadic breast cancer. *Journal of Genetics* 87(2):155-158.
- D'Andrea A. 2003. The Fanconi Anemia/BRCA signaling pathway: disruption in cisplatin-sensitive ovarian cancers. *Cell Cycle* 2(4):290.
- D'Andrea A. 2010. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *New England Journal of Medicine* 362(20):1909-1919.
- Dammann R, Li C, Yoon J, Chin P, Bates S, Pfeifer G. 2000. Epigenetic inactivation of a Ras association domain family protein from the lung tumor suppressor locus 3p21. *Nature Genetics* 25:315-319.
- Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schultze-Mosgau A, Schneider M, Weiss M. 2006. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer. 423 p.
- Elstrodt F, Hollestelle A, Nagel J, Gorin M, Wasielewski M, van den Ouweland A, Merajver S, Ethier S, Schutte M. 2006. BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Research* 66(1):41.
- Engel L, Young N, Tralka T, Lippman M, O'Brien S, Joyce M. 1978. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Research* 38(10):3352.

- Esteller M, Fraga M, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin A, Trojan J, Vaurs-Barrière C, Bignon Y, Ramus S. 2001. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Human Molecular Genetics* 10(26):3001.
- Esteller M, Silva J, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes I, Repasky E. 2000. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 92(7):564.
- Fazekas A, Steeves R, Newmaster S. 2010. Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. *Biotechniques* 48(4):277.
- García M, Fernández V, Osorio A, Barroso A, LLort G, Lázaro C, Blanco I, Caldés T, De la Hoya M, Ramón y Cajal T. 2009. Analysis of *FANCB* and *FANCN/PALB2* fanconi anemia genes in *BRCA1/2*-negative Spanish breast cancer families. *Breast Cancer Research and Treatment* 113(3):545-551.
- Gazdar A, Kurvari V, Virmani A, Gollahon L, Sakaguchi M, Westerfield M, Kodagoda D, Stasny V, Cunningham H, Wistuba I. 1998. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *International Journal of Cancer* 78:766-774.
- Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner R. 2002. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the *MLH1* gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Research* 62(14):3925.
- Gerber B. 2008. Prävention des Mammakarzinoms. *Der Gynäkologe* 41(7):490-499.
- Gilbert M, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez J, Lucas S, Jewell L, Van Marck E, Worobey M. 2007. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues—Which Methods Are Useful When? *PLoS ONE* 2(6).
- Haiman CA, Hsu C, de Bakker PIW, Frasco M, Sheng X, Van Den Berg D, Casagrande JT, Kolonel LN, Le Marchand L, Hankinson SE. 2008. Comprehensive association testing of common genetic variation in DNA repair pathway genes in relationship with breast cancer risk in multiple populations. *Human Molecular Genetics* 17(6):825-834.
- Hegi M, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, de Tribolet N, Weller M, Kros J, Hainfellner J, Mason W, Mariani L. 2005. *MGMT* gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352(10):997.
- Hess C, Ameziane N, Schuurhuis G, Errami A, Denkers F, Kaspers G, Cloos J, Joenje H, Reinhardt D, Ossenkoppele G. 2008. Hypermethylation of the *FANCC* and *FANCL* promoter regions in sporadic acute leukaemia. *Cellular Oncology* 30(4):299-306.
- Hitchins M, Ward R. 2009. Constitutional (germline) *MLH1* epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Journal of Medical Genetics* 46(12):793.

- Hitchins M, Williams R, Cheong K, Halani N, Lin V, Packham D, Ku S, Buckle A, Hawkins N, Burn J. 2005. MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 129(5):1392-1399.
- Honrado E, Osorio A, Milne R, Paz M, Melchor L, Cascón A, Urioste M, Cazorla A, Díez O, Lerma E. 2007. Immunohistochemical classification of non-BRCA1/2 tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCA families. *Modern Pathology* 20(12):1298-1306.
- <http://www.awmf-leitlinien.de/>. 1. Aktualisierung 2008. Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland
- Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U. 2006. Krebs in Deutschland 2005/2006: Häufigkeiten und Trends. Berlin: Robert Koch-Institut.
- Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss F, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner H. 1979. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *European Journal of Cancer* 15(5):659.
- Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. 2011. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature Genetics* 43(2):142-146.
- King M, Marks J, Mandell J. 2003. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302(5645):643.
- Klijn J. 2010. Early Diagnosis of Hereditary Breast Cancer by Magnetic Resonance Imaging: What Is Realistic? *Journal of Clinical Oncology* 28(9):1441.
- Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, Untch M, Rusnak DW, Spehar G, Mullin RJ. 2006. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Research* 66(3):1630-1639.
- Kutler D, Singh B, Satagopan J, Batish S, Berwick M, Giampietro P, Hanenberg H, Auerbach A. 2003. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 101(4):1249.
- Lee M, Tseng R, Hsu H, Chen J, Tzao C, Ho W, Wang Y. 2007. Epigenetic Inactivation of the Chromosomal Stability Control Genes BRCA1, BRCA2, and XRCC5 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 13(3):832.
- Lewis GD, Figari I, Fendly B, Lee Wong W, Carter P, Gorman C, Shepard HM. 1993. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185 HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 37(4):255-263.
- Marsit C, Liu M, Nelson H, Posner M, Suzuki M, Kelsey K. 2004. Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene* 23(4):1000-1004.

Meetei A, Levitus M, Xue Y, Medhurst A, Zwaan M, Ling C, Rooimans M, Bier P, Hoatlin M, Pals G. 2004. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nature Genetics* 36(11):1219-1224.

Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hubner A, Ehrentraut D, Schramm J, Felsberg J, Kahl P, Buttner R, Pietsch T. 2007. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *Journal of Molecular Diagnostics* 9(3):368.

Moldovan G, D'Andrea A. 2009. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annual Review of Genetics* 43:223-249.

Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL. 2001. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Research* 61(24):8887.

Muggerud A, Ronneberg J, Warnberg F, Botling J, Busato F, Jovanovic J, Solvang H, Bukholm I, Borresen-Dale A, Kristensen V. 2010. Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXC1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer. *Breast Cancer Research* 12(1):R3.

Narayan G, Arias-Pulido H, Nandula S, Basso K, Sugirtharaj D, Vargas H, Mansukhani M, Villella J, Meyer L, Schneider A. 2004. Promoter Hypermethylation of FANCF. *Cancer Research* 64(9):2994.

Nathanson K, Wooster R, Weber B. 2001. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nature Medicine* 7(5):552-556.

Paz M, Fraga M, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman J, Esteller M. 2003. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Research* 63(5):1114.

Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. 2009. Generations of sequencing technologies. *Genomics* 93(2):105-111.

Potapova A, Hoffman A, Godwin A, Al-Saleem T, Cairns P. 2008. Promoter hypermethylation of the PALB2 susceptibility gene in inherited and sporadic breast and ovarian cancer. *Cancer Research* 68(4):998.

Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, Reid S, Spanova K, Barfoot R, Chagtai T. 2006. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature Genetics* 39:165-167.

Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. 2008. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *European Journal of Human Genetics* 17(6):722-731.

Röhrs S, Dirks W, Meyer C, Marschalek R, Scherr M, Slany R, Wallace A, Drexler H, Quentmeier H. 2009. Hypomethylation and expression of BEX 2, IGSF 4 and TIMP 3 indicative of MLL translocations in Acute Myeloid Leukemia. *Molecular Cancer* 8(1):86.

- Rosenberg P, Alter B, Ebell W. 2008. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. *Haematologica* 93(4):511.
- Rottach A, Leonhardt H, Spada F. 2009. DNA methylation-mediated epigenetic control. *Journal of Cellular Biochemistry* 108(1):43-51.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12):5463.
- Seal S, Barfoot R, Jayatilake H, Smith P, Renwick A, Bascombe L, McGuffog L, Evans D, Eccles D, Easton D. 2003. Evaluation of Fanconi Anemia genes in familial breast cancer predisposition. *Cancer Research* 63(24):8596.
- Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, Ahmed M, Spanova K. 2006. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nature Genetics* 38(11):1239-1241.
- Shinde D, Lai Y, Sun F, Arnheim N. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis:(CA/GT) n and (A/T) n microsatellites. *Nucleic Acids Research* 31(3):974.
- Singh V, Gvindarajan R, Naik S, Kumar A. 2000. The effect of hairpin structure on PCR Amplification efficiency. *Molecular Biology Today* 1:657-659.
- Sinha S, Singh R, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda C. 2008. Alterations in candidate genes PHF2, FANCC, PTCH1 and XPA at chromosomal 9q22. 3 region: Pathological significance in early-and late-onset breast carcinoma. *Molecular Cancer* 7(1):84.
- Smiraglia D, Rush L, Frühwald M, Dai Z, Held W, Costello J, Lang J, Eng C, Li B, Wright F. 2001. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Human Molecular Genetics* 10(13):1413.
- Smith I, Mithani S, Mydlarz W, Chang S, Califano J. 2010. Inactivation of the Tumor Suppressor Genes Causing the Hereditary Syndromes Predisposing to Head and Neck Cancer via Promoter Hypermethylation in Sporadic Head and Neck Cancers. *ORL* 72(1):44-50.
- Snell C, Krypuy M, Wong E. 2008. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Research* 10(1):R12.
- Solyom S, Winqvist R, Nikkilä J, Rapakko K, Hirvikoski P, Kokkonen H, Pylkäs K. 2011. Screening for large genomic rearrangements in the FANCA gene reveals extensive deletion in a Finnish breast cancer family. *Cancer Letters* 302(2):113-118.
- Suter C, Martin D, Ward R. 2004. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nature Genetics* 36(5):497-501.

- Szaumkessel M, Richter J, Giefing M, Jarmuz M, Kiwerska K, Tönnies H, Grenman R, Heidemann S, Szyfter K, Siebert R. 2011. Pyrosequencing-based DNA methylation profiling of Fanconi anemia/BRCA pathway genes in laryngeal squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 39(2):505-514.
- Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson S, Mathew C, Joenje H, Mok S, D'Andrea A. 2003. Disruption of the Fanconi anemia–BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nature Medicine* 9(5):568-574.
- Tapia T, Smalley S, Kohen P, Munoz A, Solis L, Corvalan A, Faundez P, Devoto L, Camus M, Alvarez M. 2008. Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. *Epigenetics* 3(3):157.
- Thompson EW, Paik S, Brüner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, Shima TB, Torri J, Donahue S, Lippman ME. 1992. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *Journal of Cellular Physiology* 150(3):534-544.
- Tinelli A, Malvasi A, Leo G, Vergara D, Pisanò M, Ciccarese M, Chiuri V, Lorusso V. 2010. Hereditary ovarian cancers: from BRCA mutations to clinical management. A modern appraisal. *Cancer and Metastasis Reviews* 29:339-350.
- Tong D, Czerwenka K, Sedlak J, Schneeberger C, Schiebel I, Concin N, Leodolter S, Zeillinger R. 1999. Association of in vitro invasiveness and gene expression of estrogen receptor, progesterone receptor, pS2 and plasminogen activator inhibitor-1 in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 56(1):91-97.
- Tost J, Gut I. 2007. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature Protocols* 2(9):2265-2275.
- Trempe G. 1976. Human breast cancer in culture. *Recent Results in Cancer Research*(57):33.
- Van der Maarel S. 2008. Epigenetic mechanisms in health and disease. *British Medical Journal* 67(Suppl 3).
- Van Dongen J, Langerak A, Brüggemann M, Evans P, Hummel M, Lavender F, Delabesse E, Davi F, Schuurink E, Garcia-Sanz R. 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17(12):2257-2317.
- Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, Neveling K, Endt D, Kesterton I, Autore F, Fraternali F, Freund M, Hartmann L, Grimwade D, Roberts RG, Schaal H, Mohammed S, Rahman N, Schindler D, Mathew CG. 2010. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Genetics* 42(5):406-409.

6 | Literaturverzeichnis

Wang W. 2007. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nature Reviews Genetics* 8(10):735-748.

Wei M, Grushko T, Dignam J, Hagos F, Nanda R, Sveen L, Xu J, Fackenthal J, Tretiakova M, Das S. 2005. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy. *Cancer Research* 65(23):10692.

Wei M, Xu J, Dignam J, Nanda R, Sveen L, Fackenthal J, Grushko T, Olopade O. 2008. Estrogen receptor , BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment* 111(1):113-120.

Williams R, Lee M, Hau D, Glover J. 2004. Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1. *Nature Structural & Molecular Biology* 11(6):519-525.

7 Anhang

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Herrn Prof. Dr. R. Siebert
Frau Dr. S. Heidemann
Herrn Prof. Dr. N. Arnold
Institut für Humangenetik
Schwanenweg 24
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-1809
Telefax 04 31 / 597-5333

Datum: 26.7.2011



AZ.: D 401/05
AZ.: D 447/09
Studienplan: Studie zur Bedeutung von epigenetischen Veränderungen bei multifaktoriellen Erkrankungen und Phänotypen
und
AZ.: A 151/08
Studienplan: Etablierung eines BRCA-Funktionstestes zur Beurteilung von unklaren BRCA-Sequenzvariationen durch Bestimmung der Strahlensensibilität von BRCA-Mutationsträgerinnen

Antragsteller: Prof. Dr. R. Siebert, Dr. S. Heidemann, Institut für Humangenetik, UKSH, Campus Kiel
Prof. Dr. N. Arnold, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Kiel

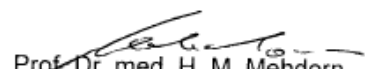
Ihr Schreiben vom: 11.7.2011 (Eingang 19.7.2011)


Sehr geehrter, lieber Herr Kollege Siebert,

vielen Dank für die Zusendung der geänderten Patienteninformationen und Einwilligungserklärungen zu den obengenannten Projekten einschließlich des Formulars zur Entbindung von der Schweigepflicht und des Votums der Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster vom 21.6.2011.

Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Änderungen keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission



medizinische
fakultät
Westfälische
Wilhelms-Universität Münster

**ETHIK
KOMMISSION**

der Ärztekammer Westfalen-Lippe
und der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität

Ethik-Kommission Münster · Gartenstraße 210 – 214 · 48147 Münster

Herrn
Prof. Dr. med. Peter Wieacker
Institut für Humangenetik
Universitätsklinikum Münster
Vesaliusweg 12-14
48149 Münster

Gartenstraße 210 – 214
48147 Münster, Germany
Tel.: +49 (0)251 929 2460
Fax: +49 (0)251 929 2478
E-Mail: ethik-kommission@aeowl.de
www.ethik-kommission.uni-muenster.de

21. Juni 2011

Unser Aktenzeichen: 2007-217-b-S (bitte immer angeben!)

Titel des Forschungsvorhabens:

„Regelversorgung mit begleitender Ergebnisforschung im Zentrum "Familiärer Brust- und Eierstockkrebs"“

hier: überarbeitete Aufklärungs- und Einwilligungsformulare

Sehr geehrter Herr Professor Wieacker,

für das oben genannte Forschungsvorhaben haben Sie überarbeitete Aufklärungs- und Einwilligungsformulare vorgelegt. Die Ethik-Kommission hat die vorgelegten Unterlagen in einem Ausschuss nach § 5 Abs. 3 S. 1 ihrer Satzung geprüft und beschlossen:

Es bestehen keine Bedenken gegen die vorgelegten Änderungen:
Aufklärung und Einwilligung in der Fassung Ihres Schreibens vom 1.6.2011.

Die vorliegende Einschätzung gilt für das Forschungsvorhaben, wie es sich auf Grundlage der in Anhang 1 genannten Unterlagen darstellt.

Für die Entscheidung der Ethik-Kommission erhebt die Ärztekammer Westfalen-Lippe Gebühren nach Maßgabe ihrer Verwaltungsgebührenordnung. Über die Gebühren erhalten Sie von der Ärztekammer einen gesonderten Bescheid.

Allgemeine Hinweise:

Mit der vorliegenden Stellungnahme berät Sie die Ethik-Kommission zu den mit Ihrem Forschungsvorhaben verbundenen berufsethischen und berufsrechtlichen Fragen gemäß § 15 Abs. 1 Satz 1 Berufsordnung Ärztekammer Westfalen-Lippe.

Die Einschätzung der Kommission ist als ergebnisoffene Beratung für den Antragsteller nicht bindend. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass unabhängig von der vorliegenden Stellungnahme die medizinische, ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung des Forschungsvorhabens bei dessen Leiter und bei allen an dem Vorhaben teilnehmenden Ärzten bzw. Forschern verbleibt.

An der Beratung und Beschlussfassung haben die in Anhang 2 aufgeführten Mitglieder der Ethik-Kommission teilgenommen. Es haben keine Kommissionsmitglieder teilgenommen, die selbst an dem Forschungsvorhaben mitwirken oder deren Interessen davon berührt werden.

Mitglieder: H.-W. Bothe (Vorsitzender), H. Pfeiffer (stellv. Vorsitzende),
F. U. Müller, P. Scheutzel, R. Rapp-Engels, M. Föcking, P. Hucklenbroich, J. Ritter, G. Rudolf, H.-D. Steinmeyer, D. Voß, W. Engemann

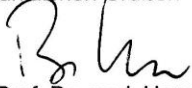
Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
EudraCT Nummer:
unser Az.: 2007-217-b-S
Schreiben EK vom 21. Juni 2011

S. 2 von 3

Die Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster ist organisiert und arbeitet gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen und den GCP-Richtlinien der ICH.

Die Kommission wünscht Ihrem Forschungsvorhaben weiterhin gutes Gelingen und geht davon aus, dass Sie nach Abschluss des Vorhabens über die Ergebnisse berichten werden.

Mit freundlichen Grüßen



Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Werner Bothe M.A.
Vorsitzender der Ethik-Kommission



KLINIKUM DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN

**ETHIK-KOMMISSION DER
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
UNIVERSITÄT ZU KÖLN
- GESCHÄFTSSTELLE -**

Ethik-Kommission – Universität zu Köln – 50924 Köln

Frau
Prof. Rita Schmutzler
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe
Uniklinik Köln

Im Hause

Klinik für Frauenheilkunde
Köln
Eing.: - 3. April 2007
Sekretariat
Frau Prof. Dr. Schmutzler

Besucheradresse:

Joseph-Stelzmann-Str. 20
Forum/Gebäude 42
50931 Köln (Lindenthal)

Postanschrift: 50924 Köln

Köln, den 27. März 2007

VORSITZENDER:
UNIV.-PROF. DR.
WALTER LEHMACHER

LEITER DER
GESCHÄFTSSTELLE:
DR. MED. GUIDO GRASS
Telefon 0221 / 478-87916

MITARBEITER
VERENA DESERNO
DIPL. GES.-ÖK. MEIKE THURAT
Telefon 0221 / 478-88844

SEKRETARIAT:
FRAU DIANA GRASS
Telefon 0221 / 478-4262
Telefax 0221 / 478-6751

Email: ek-med@uni-koeln.de

Antrags-Nr.: 07-048
**Regelversorgung mit begleitender Ergebnisforschung im Zentrum
„Familiärer Brust- und Eierstockkrebs“**

Sehr geehrte Damen und Herren,

die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln hat sich in ihrer Sitzung vom 22.03.2007 mit Ihrem Antrag befasst und diesen **zustimmend bewertet**.

Begründung

Ziel der Studie ist es, die präventiven Maßnahmen in einem standardisierten Versorgungsprozess zu evaluieren. Der potentielle Nutzen übersteigt die mit dem Vorhaben verbundenen Risiken.

Hinweise
Die Ethik-Kommission bittet um Kenntlichmachung und optische Hervorhebung der nach den Anregungen des Votums der Ethik-Kommission geänderten Passagen bei erneuter Vorlage.

Wir dürfen Sie darum bitten, die Ethik-Kommission unverzüglich von sämtlichen nachträglichen Änderungen im Prüfplan (abgesehen von rein formellen) zu unterrichten, da sie eine erneute Beratung erforderlich machen.

Die Ethik-Kommission bittet darum über alle Vorkommnisse und Änderungen des wissenschaftlichen Erkenntnisstandes, die während der Prüfung bekannt werden und die Sicherheit der Prüfungsteilnehmer oder die Durchführung der Prüfung beeinträchtigen könnten, unverzüglich informiert zu werden. Diese Information soll nur in Verbindung erfolgen mit einer Stellungnahme des Leiters der klinischen Prüfung (LKP), ob aus seiner Sicht das Nutzen-/Risiko-Verhältnis des Vorhabens verändert ist.

Klinikum der Universität zu Köln
Bank für Sozialwirtschaft Köln
Konto-Nr.: 8 150 000
BLZ / BIC: 370 205 00 /
BFSWDE31

Schreiben der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
vom 27. März 2007 – Votum 07-048

Die Ethik-Kommission bittet um Unterrichtung über den Beginn der Studie sowie ferner über einen möglichen frühzeitigen Abbruch der Studie.

Nach Abschluss des Projektes bitten wir um Übersendung eines Schlussberichtes.

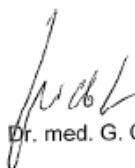
Wir bitten um Übersendung eines Zwischenberichtes innerhalb von 12 Monaten.

Entsprechend der Funktion der Ethik-Kommission betrifft dieses Votum nur die ethische Beurteilung der Konzeption, der vorgesehenen Methoden, Durchführung und Überwachung des betreffenden Projektes sowie der beabsichtigten Patientenaufklärung. Die ärztliche und juristische Verantwortung verbleibt jedoch uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern, so dass alle zivil- oder haftungsrechtlichen Folgen, die sich ergeben könnten, von dieser Seite zu tragen sind.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. W. Lehmacher



Dr. med. G. Grass

Folgende Mitglieder der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln haben an der Sitzung vom 22.03.2007 teilgenommen:

Herr Apotheker R. Bühner

Herr Prof. H. H. Hilger

Herr Prof. W. Lehmacher (Vorsitz)

Frau Professor Dr. B. Krug

Herr Assessor Dr. Dr. F. Pluisch (im schriftl. Verfahren)

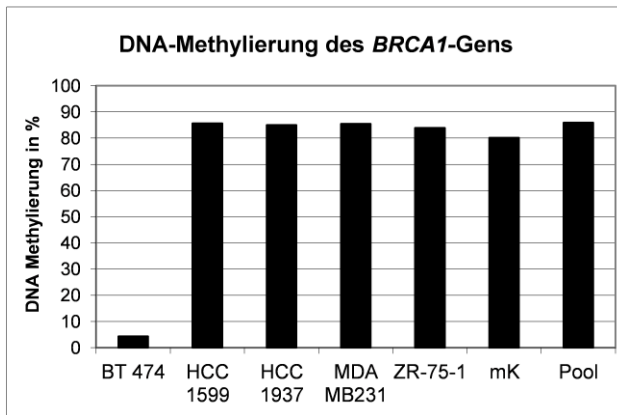


Abbildung 10: Graphische Darstellung der DNA-Methylierung des *BRCA1*-Gens in fünf Mammakarzinomzelllinien. 4/5 Mammakarzinomzelllinien zeigen eine hohe DNA-Methylierung des *BRCA1*-Gens. Eine Mammakarzinomzelllinie (BT 474) zeigt dagegen eine sehr geringe DNA-Methylierung. mK = methylierte Kontrolle; Pool = gepoolte DNA aus peripheren Blutproben.

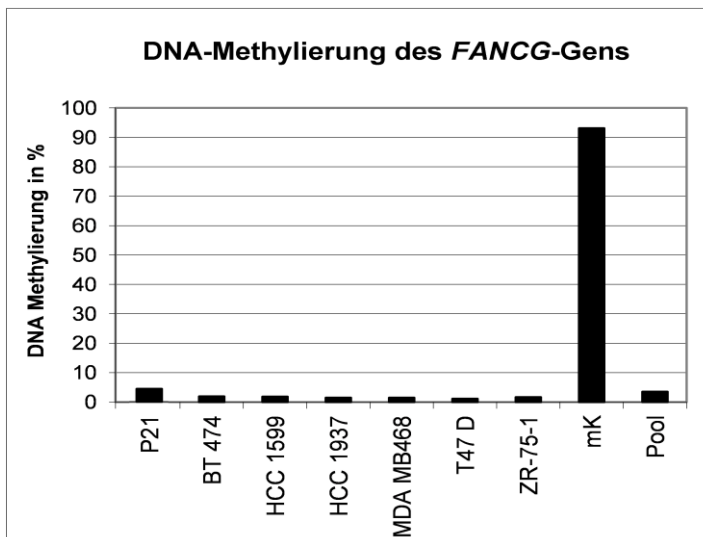


Abbildung 11: Graphische Darstellung der DNA-Methylierung des *FANCG*-Gens in sechs Mammakarzinomzelllinien und einer Tumorprobe (P21). Eine Tumorprobe und sechs Mammakarzinomzelllinien zeigen einen geringen Methylierungsgrad. mK = methylierte Kontrolle; Pool = gepoolte DNA aus peripheren Blutproben.

Tabelle 20: DNA-Methylierung des *BRCA1*-Gens in fünf Mammakarzinomzelllinien

Proben	Gewebe	BRCA Status	Erkrankungs- salter	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)									MW
							CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	
BT 474	Zelllinie	negativ	60	-	-	+	4	0	7	5	6	0	7	9	0	4
HCC 1599	Zelllinie	BRCA2	44	-	-	-	86	74	88	88	86	86	93	89	81	86
HCC 1937	Zelllinie	BRCA1	24	-	-	-	97	75	87	86	83	84	92	85	77	85
MDA MB231	Zelllinie	negativ	51	-	-	-	95	74	86	88	82	83	94	88	79	85
ZR-75-1	Zelllinie	negativ	63	+	-	-	97	77	86	90	85	86	85	84	66	84
mK	Kontrolle	E	E	E	E	E	96	67	79	83	76	83	84	84	69	80
Pool	Kontrolle	E	E	E	E	E	97	73	88	88	84	86	94	87	75	86

Es wurden Mittelwert und Standardabweichung der Methylierung bei jeder Probe angegeben. Methylierungswerte von 0-10 % wurden grün dargestellt und Methylierungswerte von >50 % wurden rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung; ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt.

74

Tabelle 21: Ergebnisse der DNA-Methylierung des *FANCG*-Gens in sieben Mammakarzinomzelllinien und einer Tumorprobe

Proben	Gewebe	BRCA Status	Staging	Erkrankungs- salter	Nodal- status	Grading	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)									MW
										CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	
P21	FFPE	BRCA2	pT2	58	pN1mi	G3	+	-	-	0	6	0	14	9	5	5	0	0	4
BT 474	Zelllinie	negativ	k.A.	60	k.A.	k.A.	-	-	+	4	0	2	3	3	3	3	0	0	2
HCC 1599	Zelllinie	BRCA2	k.A.	44	k.A.	k.A.	-	-	-	3	3	0	3	5	0	4	0	0	2
HCC 1937	Zelllinie	BRCA1	k.A.	24	k.A.	k.A.	-	-	-	2	0	2	0	2	2	3	0	2	1
MDA MB468	Zelllinie	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	-	k.A.	-	0	0	3	3	0	3	5	0	0	2
T47 D	Zelllinie	negativ	k.A.	54	k.A.	k.A.	+	+	-	2	1	1	0	2	1	0	2	1	1
ZR-75-1	Zelllinie	negativ	k.A.	63	k.A.	k.A.	+	-	-	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2
mK	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	100	93	100	87	100	86	100	94	77	93
Pool	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	3	0	4	3	4	4	6	4	4	4

Methylierungswerte von 0-10 % sind grün, Methylierungswerte von >50 % rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung; ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt.

Tabelle 22: Ergebnisse der DNA-Methylierung des *FANCC*-Gens in neun Mammakarzinomzelllinien und drei Tumorproben

Proben	Gewebe	BRCA Status	Staging	Erkrankungsalter	Nodalstatus	Grading	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)										MW
										CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	
P10	FFPE	<i>BRCA1</i> SP	ypT3	62	pN0	G3	+	+	-	2	2	3	1	2	4	3	5	2	2	3
P15	FFPE	negativ	pT3	72	pN0	G2	-	-	-	4	0	1	0	0	5	1	2	3	0	2
P21	FFPE	<i>BRCA2</i>	pT2	58	pN1mi	G3	+	-	-	4	0	5	2	0	6	3	7	2	0	3
BT 474	Zelllinie	negativ	k.A.	60	k.A.	k.A.	-	-	+	2	1	1	1	1	3	1	2	2	1	2
HCC 1599	Zelllinie	<i>BRCA2</i>	k.A.	44	k.A.	k.A.	-	-	-	2	1	1	1	1	3	1	3	2	1	2
HCC 1937	Zelllinie	<i>BRCA1</i>	k.A.	24	k.A.	k.A.	-	-	-	2	1	0	1	1	3	1	2	2	0	1
MDA MB231	Zelllinie	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	-	-	-	4	2	2	2	2	5	2	4	4	2	3
MDA MB468	Zelllinie	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	-	k.A.	-	2	1	1	1	1	3	1	2	2	1	1
SK BR 3	Zelllinie	negativ	k.A.	43	k.A.	k.A.	-	-	+	1	1	1	2	1	3	2	2	2	0	2
T47 D	Zelllinie	negativ	k.A.	54	k.A.	k.A.	+	+	-	2	1	1	1	1	3	1	2	2	1	1
ZR-75-1	Zelllinie	negativ	k.A.	63	k.A.	k.A.	+	-	-	3	1	1	1	1	3	1	2	1	1	1
KBR-1	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	2	1	2	1	1	3	1	2	2	0	1
KBR-2	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	3	2	0	2	1	3	1	2	3	0	2
KBR-3	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	2	1	1	2	1	3	1	2	2	0	2
KBR-4	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	3	1	1	2	1	3	1	2	2	0	2
KBR-5	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	6	3	2	4	3	6	2	4	4	2	3
mK	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	96	92	93	87	83	93	81	93	97	67	88
Pool	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	3	2	1	1	2	4	2	3	3	1	2
MW der Kontrollen										2,9	1,6	1,1	1,9	1,5	3,6	1,4	2,5	2,6	0,3	1,9
STABW										1,5	0,7	0,7	1	0,8	1,6	0,5	0,7	0,9	0,8	0,8
3x STABW										4,6	2,1	2,1	2,9	2,3	4,7	1,4	2,1	2,8	2,3	2,5

Normalmethylierte Werte sind in blau und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt

Tabelle 23: Ergebnisse der DNA-Methylierung des *FANCD2*-Gens in neun Mammakarzinomzelllinien und drei Tumorproben

Proben	Gewebe	Tumorzell- gehalt	BRCA Status	Staging	Erkrank- ungsalter	Nodal- status	Grading	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)					
											CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	MW
P10	FFPE	50 % (Z.n.Chemo)	<i>BRCA1</i> SP	ypT3	62	pN0	G3	+	+	-	0	0	2	0	4	1
P17	FFPE	20-30 %	negativ	ypT1c	34	pN0	G2	+	+	+	2	3	0	0	3	2
P21	FFPE	>80 %	<i>BRCA2</i>	pT2	58	pN1mi	G3	+	-	-	2	4	3	2	4	3
BT 474	Zelllinie	E	negativ	k.A.	60	k.A.	k.A.	-	-	+	2	3	0	1	2	2
HCC 1599	Zelllinie	E	<i>BRCA2</i>	k.A.	44	k.A.	k.A.	-	-	-	1	1	0	2	2	1
HCC 1937	Zelllinie	E	<i>BRCA1</i>	k.A.	24	k.A.	k.A.	-	-	-	2	2	0	0	2	1
MDA MB231	Zelllinie	E	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	-	-	-	3	3	2	3	4	3
MDA MB468	Zelllinie	E	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	-	k.A.	-	2	2	1	0	2	1
SK BR 3	Zelllinie	E	negativ	k.A.	43	k.A.	k.A.	-	-	+	1	2	1	0	2	1
T47 D	Zelllinie	E	negativ	k.A.	54	k.A.	k.A.	+	+	-	1	0	0	0	2	1
ZR-75-1	Zelllinie	E	negativ	k.A.	63	k.A.	k.A.	+	-	-	2	2	2	0	2	2
KBR-1	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	2	1	2	0	3	2
KBR-2	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	0	0	0	0	0	0
KBR-3	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	1	1	0	1	2	1
KBR-4	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	1	0	1	0	2	1
KBR-5	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	3	3	2	3	5	3
KBR-8	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	1	0	1	0	2	1
mK	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	90	90	4	77	81	68
Pool	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	2	2	3	1	2	2
MW der Kontrollen											1,4	0,9	1,2	0,7	2,2	1,3
STABW											1,0	1,1	1,0	1,2	1,5	1,0
3x STABW											3,0	3,2	3,1	3,6	4,4	3,1

Normalmethylierte Werte sind in blau und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt

Tabelle 24: Ergebnisse der DNA-Methylierung des *FANCF*-Gens (*BRIP1*) in neun Mammakarzinomzelllinien und zwei Tumorproben

Proben	Gewebe	Tumorzell- gehalt	BRCA Status	Staging	Erkrank- ungsalter	Nodal- status	Grading	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)						
											CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	MW
P10	FFPE	50 % (Z.n.Chemo)	<i>BRCA1</i> SP	ypT3	62	pN0	G3	+	+	-	1	4	3	0	2	4	2
P15	FFPE	60 %	negativ	pT3	72	pN0	G2	-	-	-	1	2	0	3	1	0	1
BT 474	Zelllinie	E	negativ	k.A.	60	k.A.	k.A.	-	-	+	1	2	2	2	1	2	2
HCC 1599	Zelllinie	E	<i>BRCA2</i>	k.A.	44	k.A.	k.A.	-	-	-	5	3	0	0	2	4	2
HCC 1937	Zelllinie	E	<i>BRCA1</i>	k.A.	24	k.A.	k.A.	-	-	-	1	3	2	0	0	3	1
MDA MB231	Zelllinie	E	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	-	-	-	3	6	2	0	0	2	2
MDA MB468	Zelllinie	E	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	-	k.A.	-	1	2	2	10	0	2	3
SK BR 3	Zelllinie	E	negativ	k.A.	43	k.A.	k.A.	-	-	+	1	3	0	0	0	0	1
T47 D	Zelllinie	E	negativ	k.A.	54	k.A.	k.A.	+	+	-	1	4	2	2	1	0	2
ZR-75-1	Zelllinie	E	negativ	k.A.	63	k.A.	k.A.	+	-	-	1	2	1	0	0	2	1
KBR-1	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	2	3	0	0	0	0	1
KBR-2	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	12	15	12	12	11	33	16
KBR-3	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	1	2	0	2	0	0	1
KBR-4	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	1	2	1	10	2	21	6
KBR-5	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	1	3	1	3	1	55	11
mK	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	55	54	49	47	55	73	56
Pool	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	2	2	2	2	2	8	3
MW der Kontrollen											3,4	5,2	3,0	5,5	2,7	21,8	6,9
STABW											4,8	5,8	5,1	5,4	4,7	23,2	6,5
3x STABW											14,3	17,3	15,2	16,2	14,0	69,5	19,4

Normalmethylierte Werte sind in blau und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt.

Tabelle 25: Ergebnisse der DNA-Methylierung des *FANCL*-Gens in neun Mammakarzinomzelllinien

Proben	Gewebe	BRCA Status	Erkrankungsalter	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)								MW
							CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	
BT 474	Zelllinie	negativ	60	-	-	+	4	0	5	4	0	0	2	3	2
HCC 1599	Zelllinie	<i>BRCA2</i>	44	-	-	-	2	3	2	2	0	2	1	2	2
HCC 1937	Zelllinie	<i>BRCA1</i>	24	-	-	-	3	2	0	3	0	2	0	1	2
MDA MB231	Zelllinie	negativ	51	-	-	-	5	5	3	4	0	3	3	3	3
MDA MB468	Zelllinie	negativ	51	-	k.A.	-	3	0	0	3	0	0	2	3	1
SK BR 3	Zelllinie	negativ	43	-	-	+	0	0	0	5	0	0	2	3	1
T47 D	Zelllinie	negativ	54	+	+	-	3	2	2	3	2	2	2	2	2
ZR-75-1	Zelllinie	negativ	63	+	-	-	4	3	3	3	0	0	3	3	2
KBR-1	Kontrolle	E	E	E	E	E	0	4	0	6	0	0	3	4	2
KBR-2	Kontrolle	E	E	E	E	E	2	2	0	4	0	0	2	2	1
KBR-3	Kontrolle	E	E	E	E	E	0	0	0	3	0	0	2	3	1
KBR-4	Kontrolle	E	E	E	E	E	0	0	0	3	0	0	2	3	1
KBR-5	Kontrolle	E	E	E	E	E	2	4	5	3	2	3	4	3	3
KBR-8	Kontrolle	E	E	E	E	E	2	2	0	3	0	0	1	2	1
mK	Kontrolle	E	E	E	E	E	93	91	90	94	86	72	94	94	89
Pool	Kontrolle	E	E	E	E	E	2	3	3	3	0	2	3	3	2
MW der Kontrollen							1,1	1,9	0,9	3,6	0,3	0,5	2,4	2,8	1,7
STABW							1,2	1,7	2,1	1,1	0,8	1,1	0,9	0,7	0,9
3x STABW							3,6	5,2	6,3	3,2	2,4	3,3	2,8	2,1	2,6

Normalmethylierte Werte sind in blau und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt

Tabelle 26: Ergebnisse der DNA-Methylierung des *FANCN*-Gens (PALB2) in neun Mammakarzinomzelllinien und zwei Tumorproben

Proben	Gewebe	Tumorzell- gehalt	BRCA Status	Staging	Erkrank- ungsalter	Nodal- status	Grading	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)							
											CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	MW
P10	FFPE	50 % (Z.n.Chemo)	<i>BRCA1</i> SP	ypT3	62	pN0	G3	+	+	-	3	0	0	5	0	2	3	2
P21	FFPE	>80 %	<i>BRCA2</i>	pT2	58	pN1mi	G3	+	-	-	0	4	3	2	2	6	3	3
BT 474	Zelllinie	E	negativ	k.A.	60	k.A.	k.A.	-	-	+	0	2	1	2	1	2	2	1
HCC 1599	Zelllinie	E	<i>BRCA2</i>	k.A.	44	k.A.	k.A.	-	-	-	1	2	1	1	1	2	2	1
HCC 1937	Zelllinie	E	<i>BRCA1</i>	k.A.	24	k.A.	k.A.	-	-	-	1	1	0	1	0	0	0	1
MDA MB231	Zelllinie	E	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	-	-	-	2	3	2	3	1	2	2	2
MDA MB468	Zelllinie	E	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	-	k.A.	-	2	2	0	2	0	2	0	1
SK BR 3	Zelllinie	E	negativ	k.A.	43	k.A.	k.A.	-	-	+	1	2	0	2	1	2	2	1
T47 D	Zelllinie	E	negativ	k.A.	54	k.A.	k.A.	+	+	-	1	1	1	2	0	1	2	1
ZR-75-1	Zelllinie	E	negativ	k.A.	63	k.A.	k.A.	+	-	-	2	1	0	2	0	1	2	1
KBR-1	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	0	2	1	2	2	2	2	1
KBR-3	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	1	0	0	1	0	1	2	1
KBR-5	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	3	1	2	2	1	3	5	3
KBR-8	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	2	2	0	2	0	2	0	1
mK	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	91	88	83	89	78	92	91	87
Pool	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	2	3	2	2	2	3	2	2
MW der Kontrollen											1,5	1,2	0,7	1,7	0,8	1,7	2,1	1,4
STABW											1,4	0,8	0,9	0,6	0,9	0,6	1,9	0,8
3x STABW											4,1	2,5	2,7	1,9	2,6	1,8	5,7	2,4

Normalmethylierte Werte sind in blau und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung.

ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt

Tabelle 27: Ergebnisse der Methylierung des *FANCA*-Gens in Tumorproben und Mammakarzinomzelllinien

Proben	Gewebe	Tumorzell- gehalt	BRCA Status	Staging	Erkrank- ungsalter	Nodal- status	Metast- asierun- g	Gradin- g	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)						
												CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	MW
P2	FFPE	>80	negativ	pT1c	39	pN0	M0	G2	+	+	+	15	20	19	15	13	14	16
P4	FFPE	>80 (wenig LK)	<i>BRCA1</i>	pT1c	51	pN1a	M0	G3	+	+	-	21	25	15	16	33	33	24
P8	FFPE	70 %	<i>BRCA1</i>	pT1c	53	pN0	M0	G2	-	-	-	41	43	23	28	26	24	31
P22	FFPE	30 %	negativ	pT3	44	pN0	M0	G2	+	-	+	45	26	23	12	47	49	34
P13	FFPE	5-10 %	negativ	pT1b	25	pN0	M0	G2	+	+	k.A.	38	38	42	33	32	20	34
P14	FFPE	80 %	<i>BRCA1</i>	pT2	38	pN0	Mx	G3	+	+	+	44	46	45	28	37	39	40
P6	FFPE	40 %	<i>BRCA1</i>	ypT3	40	ypN1a	M0	Gx	-	-	-	49	47	44	31	38	39	41
P20	FFPE	50-60 %	negativ	pT2	62	pN2a	M0	G2	+	+	+	34	50	36	37	51	48	43
P18	FFPE	40 %	negativ	pT1c	46	pN2a	M0	G3	+	+	k.A.	48	57	51	29	38	42	44
P19	FFPE	50 % (LK)	negativ	pT3	47	pN3a	M0	G3	+	+	+	53	63	41	32	41	39	45
P3	FFPE	10-20 %	negativ	pT2	53	pN0	k.A.	G2	+	+	-	54	56	43	50	51	49	51
P1	FFPE	>80	negativ	rpT2	83	k.A.	k.A.	G2	+	+	+	56	48	47	39	58	64	52
P7	FFPE	100 %	negativ	ypT1b	36	ypN1m i	Mx	k.A.	+	+	+	51	60	55	35	51	66	53
P10	FFPE	50 % (Z.n.Chemo)	<i>BRCA1</i> SP	ypT3	62	pN0	M0	G3	+	+	-	74	60	60	40	55	60	58
P17	FFPE	20-30 %	negativ	ypT1c	34	pN0	M0	G2	+	+	+	25	73	79	63	71	74	64
P26	FFPE	20 %	<i>BRCA2</i>	pT2	33	pN1	k.A.	G1	+	+	-	72	83	64	46	65	61	65
P9	FFPE	80 %	negativ	pT2	34	pN0	k.A.	G3	+	+	+	73	83	89	53	67	47	68
P25	FFPE	>85 % (ma)	negativ	pT1c	65	pN1	M0	G2	+	+	+	75	73	79	52	69	67	69
P21	FFPE	>80 %	<i>BRCA2</i>	pT2	58	pN1mi	M0	G3	+	-	-	95	68	65	47	61	79	69
P24	FFPE	15-20 %	negativ	pT1c	60	pN0	pMx	G2	+	+	-	100	100	5	68	90	80	74
P5	FFPE	50-60 %	<i>BRCA2</i>	pT1c	55	pN0	M0	G3	+	+	+	89	87	92	39	69	67	74
P16	FFPE	>85 % (ma)	negativ*	pT1c	58	pN0	M0	G3	-	+	+	93	95	100	80	72	8	75
P23	FFPE	20 %	negativ	pT1c	35	pN0	M0	G2	+	+	-	89	94	69	45	78	77	75
P12	FFPE	20-25 %	negativ	rpT1	59	k.A.	k.A.	G2	+	+	-	91	88	94	72	39	73	76
HCC 1599	Zelllinie	E	<i>BRCA2</i>	k.A.	44	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	-	8	6	3	7	16	9	8
T47 D	Zelllinie	E	negativ	k.A.	54	k.A.	k.A.	k.A.	+	+	-	6	8	6	6	18	12	9

SK BR 3	Zelllinie	E	negativ	k.A.	43	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	+	31	30	7	5	6	4	14
MDA MB468	Zelllinie	E	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	k.A.	-	k.A.	-	14	21	13	4	20	17	15
BT 474	Zelllinie	E	negativ	k.A.	60	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	+	68	64	41	51	43	41	51
ZR-75-1	Zelllinie	E	negativ	k.A.	63	k.A.	k.A.	k.A.	+	-	-	87	84	67	53	68	72	72
MDA MB231	Zelllinie	E	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	-	93	94	86	67	71	74	81
HCC 1937	Zelllinie	E	BRCA1	k.A.	24	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	-	94	97	93	71	71	78	84
KBR-1	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	77	80	74	60	71	74	73
KBR-2	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	65	72	62	48	61	62	62
KBR-3	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	68	70	52	52	70	73	64
KBR-4	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	69	72	65	48	61	62	63
KBR-5	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	79	82	76	56	66	68	71
KBR-6	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	73	74	64	53	68	68	67
KBR-7	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	64	64	62	40	49	54	55
KBR-8	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	67	76	65	47	64	65	64
mK	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	94	92	83	80	76	85	85
Pool	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	89	95	90	65	68	76	81
MW der Kontrollen												70,0	73,6	65,0	50,6	63,9	65,7	64,8
STABW												5,6	5,8	7,3	6,0	7,0	6,6	5,5
3x STABW												16,9	17,3	21,8	18,1	21,1	19,7	16,4

Normalmethylierte Werte sind in blau, hypomethylierte in grün und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; LK = Lymphknoten in Schnitten; ma = manuell angereichert; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt.

Rot markierte Proben waren nicht auswertbar, da in der PCR schlechte Signale erzielt wurden und mehrere Messungen unterschiedliche Werte zeigten.

* BRCA-Test entfällt bei negativer Indexpatientin (Schwester (P17))

Tabelle 28: Ergebnisse der Methylierung des *FANCB*-Gens in Tumorproben und Mammakarzinomzelllinien

Proben	Gewebe	Tumorzell- gehalt	BRCA Status	Staging	Erkrank- ungsalter	Nodal- status	Metastas- -ierung	Grading	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)										
												CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	CpG 11
P15	FFPE	60 %	negativ	pT3	72	pN0	M0	G2	-	-	-	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P2	FFPE	>80	negativ	pT1c	39	pN0	M0	G2	+	+	+	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	1
P19	FFPE	50 % (LK)	negativ	pT3	47	pN3a	M0	G3	+	+	+	2	3	3	4	4	nA	5	5	3	5	4
P12	FFPE	20-25 %	negativ	rpT1	59	k.A.	k.A.	G2	+	+	-	9	16	12	17	18	13	10	15	12	10	13
P11	FFPE	40-50 %	negativ	ypT2	59	ypN0	k.A.	G3	-	-	-	13	14	13	20	22	6	24	16	13	13	15
P18	FFPE	40 %	negativ	pT1c	46	pN2a	M0	G3	+	+	k.A.	18	20	16	18	19	16	17	21	14	8	11
P10	FFPE	50 %	BRCA1	ypT3	62	pN0	M0	G3	+	+	-	15	22	16	22	21	16	21	26	13	16	9
P21	FFPE	>80 %	BRCA2	pT2	58	pN1mi	M0	G3	+	-	-	20	24	18	22	21	16	18	24	14	10	13
P20	FFPE	50-60 %	negativ	pT2	62	pN2a	M0	G2	+	+	+	37	19	19	16	42	42	25	40	24	6	6
P9	FFPE	80 %	negativ	pT2	34	pN0		G3	+	+	+	16	35	37	40	45	13	18	50	19	28	19
P1	FFPE	>80	negativ	rpT2	83	k.A.	k.A.	G2	+	+	+	57	35	34	32	59	32	34	58	31	31	29
P26	FFPE	20 %	BRCA2	pT2	33	pN1	k.A.	G1	+	+	-	43	46	32	50	51	31	42	42	43	32	41
P25	FFPE	>85 % (ma)	negativ	pT1c	65	pN1	M0	G2	+	+	+	46	47	42	51	50	45	46	53	38	29	42
P6	FFPE	40 %	BRCA1	ypT3	40	ypN1a	M0	Gx	-	-	-	52	45	43	55	54	42	49	49	45	37	32
P4	FFPE	>80	BRCA1	pT1c	51	pN1a	M0	G3	+	+	-	45	54	50	57	51	53	43	55	47	40	32
P14	FFPE	80 %	BRCA1	pT2	38	pN0	Mx	G3	+	+	+	62	66	55	73	73	63	50	79	47	30	39
P22	FFPE	30 %	negativ	pT3	44	pN0	M0	G2	+	-	+	32	57	44	67	80	75	61	70	77	53	31
P16	FFPE	>85 % (ma)	negativ*	pT1c	58	pN0	M0	G3	-	+	+	62	67	62	62	64	64	60	84	59	36	42
MDA	Zelllinie	E	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	k.A.	-	k.A.	-	1	2	1	2	2	1	2	2	2	0	0
T47 D	Zelllinie	E	negativ	k.A.	54	k.A.	k.A.	k.A.	+	+	-	1	2	1	2	1	1	2	2	2	1	2
BT 474	Zelllinie	E	negativ	k.A.	60	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	+	1	2	2	2	2	2	3	2	2	0	2
HCC	Zelllinie	E	BRCA2	k.A.	44	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	-	1	1	0	1	2	1	2	4	2	0	2
MDA	Zelllinie	E	negativ	k.A.	51	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	-	4	4	3	4	4	3	5	3	5	3	2
SK BR 3	Zelllinie	E	negativ	k.A.	43	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	+	7	15	3	24	25	9	34	24	22	27	29
ZR-75-1	Zelllinie	E	negativ	k.A.	63	k.A.	k.A.	k.A.	+	-	-	28	33	28	32	32	32	15	28	24	23	22
HCC	Zelllinie	E	BRCA1	k.A.	24	k.A.	k.A.	k.A.	-	-	-	34	38	33	36	35	37	35	34	33	28	31
KBR-1	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	38	31	29	42	40	29	31	42	29	23	21
KBR-2	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	36	37	27	43	43	33	36	41	26	25	19
KBR-3	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	32	26	18	41	42	23	25	39	25	22	15
KBR-4	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	35	31	32	42	39	25	33	41	22	23	19
KBR-5	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	36	33	19	47	43	27	38	44	29	21	18
KBR-6	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	36	23	15	48	48	29	25	47	30	16	20
KBR-7	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	36	28	25	48	42	28	35	44	27	22	23

KBR-8	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	30	28	22	40	42	25	31	39	22	21	14	29	
mK	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	85	89	88	89	91	92	94	93	86	81	79	88	
Pool	Kontrolle	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	27	22	17	28	30	19	24	29	18	15	16	22	
												MW der Kontrollen	34,8	29,6	23,4	43,8	42,4	27,5	31,6	42,1	26,2	21,5	18,6	31,1
												STABW	2,7	4,4	5,9	3,4	2,7	3,0	4,9	2,8	3,1	2,5	3,0	1,9
												3x STABW	8,0	13,2	17,8	10,1	8,0	9,1	14,6	8,3	9,4	7,6	8,9	5,7

Normalmethylierte Werte sind in blau, hypomethylierte in grün und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; LK = Lymphknoten in Schnitten; na = nicht auswertbar; ma = manuell angereichert; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt.* BRCA-Test entfällt bei negativer Indexpatientin (Schwester (P17))

Tabelle 29: Ergebnisse der Methylierung des *FANCA*-Gens im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen

Proben	BRCA Status	Staging	Erkrankungsalter	Nodalstatus	Metastasierung	Grading	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)						
										CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	MW
P1	negativ	rpT2	83	k.A.	k.A.	G2	+	+	+	92	90	91	66	70	78	81
P2	negativ	pT1c	39	pN0	M0	G2	+	+	+	94	94	91	68	74	80	84
P3	negativ	pT2	53	pN0	k.A.	G2	+	+	-	94	94	91	69	71	75	82
P4	BRCA1	pT1c	51	pN1a	M0	G3	+	+	-	93	92	92	69	71	80	83
P5	BRCA2	pT1c	55	pN0	M0	G3	+	+	+	92	93	85	70	73	77	82
P6	BRCA1	ypT3	40	ypN1a	M0	Gx	-	-	-	92	90	91	69	67	76	81
P7	negativ	ypT1b	36	ypN1mi	Mx	k.A.	+	+	+	91	91	90	67	70	99	85
P8	BRCA1	pT1c	53	pN0	M0	G2	-	-	-	90	89	88	66	67	75	79
P9	negativ	pT2	34	pN0	k.A.	G3	+	+	+	94	93	90	69	74	81	83
P10	BRCA1 SP	ypT3	62	pN0	M0	G3	+	+	-	92	91	89	69	67	78	81
P12	negativ	rpT1	59	k.A.	k.A.	G2	+	+	-	91	91	89	65	68	79	81
P13	negativ	pT1b	25	pN0	M0	G2	+	+	k.A.	92	92	90	67	74	99	86
P14	BRCA1	pT2	38	pN0	Mx	G3	+	+	+	98	94	88	76	79	84	87
P16	negativ*	pT1c	58	pN0	M0	G3	-	+	+	91	92	90	62	64	99	83
P17	negativ	ypT1c	34	pN0	M0	G2	+	+	+	93	93	90	68	73	79	83
P18	negativ	pT1c	46	pN2a	M0	G3	+	+	k.A.	88	87	86	61	64	69	76
P19	negativ	pT3	47	pN3a	M0	G3	+	+	+	90	91	87	63	64	74	78
P20	negativ	pT2	62	pN2a	M0	G2	+	+	+	92	91	89	66	72	99	85
P21	BRCA2	pT2	58	pN1mi	M0	G3	+	-	-	84	80	80	60	63	98	77
P23	negativ	pT1c	35	pN0	M0	G2	+	+	-	89	91	88	66	68	75	80
P24	negativ	pT1c	60	pN0	pMx	G2	+	+	-	95	91	90	69	71	77	82
P26	BRCA2	pT2	33	pN1	k.A.	G1	+	+	-	88	88	77	75	73	80	80
KBW-1	E	E	E	E	E	E	E	E	E	89	92	86	64	65	72	78
KBW-2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	87	89	88	62	63	73	77
KBW-3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	90	92	89	63	64	72	79
KBW-4	E	E	E	E	E	E	E	E	E	85	87	83	55	62	69	74
KBW-5	E	E	E	E	E	E	E	E	E	88	86	86	61	63	72	76
KBW-6	E	E	E	E	E	E	E	E	E	83	88	82	60	66	73	75
KBW-7	E	E	E	E	E	E	E	E	E	86	85	87	61	63	74	76
KBW-8	E	E	E	E	E	E	E	E	E	87	93	88	62	62	71	77
KBW-9	E	E	E	E	E	E	E	E	E	82	84	79	55	59	65	71
KBW-10	E	E	E	E	E	E	E	E	E	89	92	88	64	63	72	78
mK	E	E	E	E	E	E	E	E	E	94	92	83	80	76	85	85
Pool	E	E	E	E	E	E	E	E	E	89	95	90	65	68	76	81
MW der Kontrollen										86,6	88,7	85,7	60,9	63,1	71,3	76,0
STABW										2,7	3,2	3,2	3,3	1,7	2,7	2,4
3x STABW										8,2	9,6	9,6	9,8	5,2	8,0	7,1

Normalmethylierte Werte sind in blau und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt; * BRCA-Test entfällt bei negativer Indexpatientin (Schwester (P17))

Tabelle 30: Ergebnisse der Methylierung des *FANCB*-Gens im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen

Proben	BRCA Status	Staging	Erkrankungsalter	Nodal-status	Grading	ÖR	PR	Her2	DNA-Methylierung (%)											MW
									CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	CpG 11	
P1	negativ	rpT2	83	k.A.	G2	+	+	+	40	31	34	42	38	21	37	41	19	30	16	32
P2	negativ	pT1c	39	pN0	G2	+	+	+	37	30	28	42	43	26	33	42	19	32	21	32
P4	BRCA1	pT1c	51	pN1a	G3	+	+	-	28	25	14	39	40	27	31	42	29	24	16	29
P6	BRCA1	ypT3	40	ypN1a	Gx	-	-	-	38	37	25	42	41	28	30	42	22	24	19	32
P9	negativ	pT2	34	pN0	G3	+	+	+	39	36	34	46	39	33	36	46	34	22	Na	36
P10	BRCA1	ypT3	62	pN0	G3	+	+	-	35	37	26	41	39	24	26	39	29	24	26	32
P11	negativ	ypT2	59	ypN0	G3	-	-	-	38	39	25	43	37	26	39	41	27	22	19	33
P12	negativ	rpT1	59	k.A.	G2	+	+	-	37	33	25	47	44	23	37	42	25	29	18	33
P14	BRCA1	pT2	38	pN0	G3	+	+	+	30	28	25	38	41	22	28	38	23	24	16	29
P15	negativ	pT3 (DCIS)	72	pN0	G2	-	-	-	40	35	30	41	42	23	33	37	35	17	31	33
P16	negativ*	pT1c	58	pN0	G3	-	+	+	33	31	26	42	40	22	35	41	18	24	19	30
P18	negativ	pT1c	46	pN2a	G3	+	+	k.A.	36	31	22	42	44	29	34	43	26	24	17	31
P19	negativ	pT3	47	pN3a	G3	+	+	+	39	34	30	40	41	31	22	37	26	27	25	32
P20	negativ	pT2	62	pN2a	G2	+	+	+	37	32	24	35	36	25	27	37	21	21	19	28
P21	BRCA2	pT2	58	pN1mi	G3	+	-	-	21	23	18	27	25	21	22	26	16	17	16	21
P26	BRCA2	pT2	33	pN1	G1	+	+	-	85	94	90	88	88	90	95	94	86	81	80	88
KBW-1	E	E	E	E	E	E	E	E	37	33	32	46	47	20	42	45	26	30	17	34
KBW-2	E	E	E	E	E	E	E	E	36	35	27	41	43	33	31	41	23	29	24	33
KBW-3	E	E	E	E	E	E	E	E	33	33	28	39	45	25	28	42	21	21	19	30
KBW-4	E	E	E	E	E	E	E	E	38	32	22	47	41	22	32	40	29	25	21	32
KBW-5	E	E	E	E	E	E	E	E	35	33	30	46	43	20	38	51	24	33	27	34
KBW-6	E	E	E	E	E	E	E	E	37	29	27	38	47	23	30	44	23	21	19	31
KBW-7	E	E	E	E	E	E	E	E	37	26	29	39	43	24	33	34	20,2	25	23	30
KBW-8	E	E	E	E	E	E	E	E	37	34	30	44	43	27	33	45	24,8	23	20	33
KBW-9	E	E	E	E	E	E	E	E	43	35	33	46	49	33	34	48	26,0	29	28	37
KBW-10	E	E	E	E	E	E	E	E	38	28	30	38	42	24	34	41	24,4	22	20	31
mK	E	E	E	E	E	E	E	E	85	89	88	89	91	92	94	93	86,1	81	79	88
Pool	E	E	E	E	E	E	E	E	27	22	17	28	30	19	24	29	17,5	15	16	22
MW der weiblichen Kontrollen									37,0	31,6	28,7	42,3	44,1	25,1	33,4	42,8	24,0	25,8	21,7	32,4
STABW									2,4	3,0	3,3	3,7	2,4	4,9	4,0	4,7	2,5	4,3	3,5	2,1
3x STABW									7,1	8,9	9,9	11,1	7,3	14,6	11,9	14,1	7,6	13,0	10,5	6,2

Normalmethylierte Werte sind in blau, hypomethylierte in grün und hypermethylierte Werte in rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; na = nicht auswertbar; k.A. = keine Angabe; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung, ÖR = Östrogenrezeptor; PR = Progesteronrezeptor; Her2 = Her2/neu-Rezeptor; E = Entfällt; * BRCA-Test entfällt bei negativer Indexpatientin (Schwester (P17))

Tabelle 31: Ergebnisse der Methylierung des *FANCB*-Gens im peripheren Blut der männlichen Kontrollen

Name	Gewebe	DNA-Methylierung (%)											
		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	CpG 11	MW
KBM-1	Blut	0	0	3	2	2	2	3	2	4	0	0	2
KBM-2	Blut	2	0	2	3	4	2	4	0	3	2	0	2
KBM-3	Blut	0	0	3	4	0	0	5	5	3	3	0	2
KBM-4	Blut	5	0	3	0	2	0	3	3	5	4	0	2
KBM-5	Blut	2	0	3	0	2	4	3	4	5	0	0	2
KBM-6	Blut	0	0	3	4	8	0	3	5	4	0	0	3
KBM-7	Blut	0	0	0	0	4	0	3	2	0	0	0	1
KBM-8	Blut	3	2	2	4	4	3	2	3	0	4	3	3
KBM-9	Blut	3	3	0	0	3	0	4	0	3	0	0	1
KBM-10	Blut	5	4	4	5	5	5	6	5	0	4	5	4
mK	Kontrolle	85	89	88	89	91	92	94	93	86	81	79	88
Pool	Kontrolle	27	22	17	28	30	19	24	29	18	15	16	22
	MW der männlichen Kontrollen	2,0	0,9	2,2	2,2	3,3	1,6	3,5	2,9	2,7	1,8	0,8	2,2
	STABW	2,0	1,4	1,4	2,0	2,1	1,9	1,2	1,9	2,0	2,0	1,7	0,9

Es wurden Mittelwert und Standardabweichung der Methylierung bei jeder Probe angegeben. Methylierungswerte von 0-10 % wurden grün, Werte von 10-50 % blau und Methylierungswerte von größer 50 % in rot dargestellt. mK = methylierte Kontrolle; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung.

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit konnte nur mit Hilfe vieler Leute entstehen, die mir tatkräftig zur Seite standen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Ute Jacobsen und Frau Elke Heiden, die mir bei der praktischen Umsetzung sehr geholfen haben.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Simone Heidemann für ihre allzeitige, freundliche und motivierende Hilfe.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Julia Richter für die technische Betreuung meiner Arbeit.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Holger Tönnies bin ich zu großem Dank verpflichtet für die konstruktiven und wegweisenden Ratschläge und die Hilfe die für den Abschluss meiner Doktorarbeit so wichtig waren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Reiner Siebert für das Überlassen des Themas der vorliegenden Doktorarbeit.

Zudem möchte ich mich bedanken bei Marcin Szaumkessel, Dr. Micaela Mathiak, Prof. Dr. Arnold, Dr. Özkan Alkasi, Herrn Rösel, Frau Janne, Frau Hamann und vielen weiteren nicht namentlich genannten fleißigen Helfern.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung und Liebe danken, die sie mir zuteil kommen lässt.

9 Curriculum vitae

Name: Robin Philipp Zazoff

Geburtsdatum: 04.07.1985 Geburtsort: Hamburg

Emailadresse: r.zazoff@googlemail.com

Bildungsweg:

1992 - 2005	Rudolf-Steiner-Schule-Hamburg-Altona
2004	Realschulabschluss
2005	Abitur
2005	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2007	Hochschulwechsel zur Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Abschluss des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Oktober 2012	Assistenzarzt Kardiologie im Städtischen Krankenhaus Kiel

Promotion: 2008-2013 am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel mit dem Thema „DNA-Methylierung ausgewählter *BRCA*- und Fanconi Anämie Gene beim familiären Mammakarzinom“.

Veröffentlichung:

Poster: Analysis of promoter methylation of Fanconi anemia genes in familial breast cancer.
Zazoff R., Richter J., Szaumkessel M., Mathiak M., Alkasi Ö., Arnold N., Jonat W., Siebert R., Tönnies H., Heidemann S.

Jahrestagung 2011 der Gesellschaft für Humangenetik 16.-18.3.2011, Regensburg