

Diplomarbeit

**Identifizierung und Charakterisierung von Tumorsuppressor-
Kandidatengenen für das Mammakarzinom des Menschen
auf dem Chromosom 8
und
Mutationsanalyse des putativen Tumorsuppressorgens
LZTS1 (leucin zipper tumor suppressor 1)
in sporadischem und familiärem Mammakarzinom**

vorgelegt von
Dagmar Siele

Am 26. Nov. 2003

Betreuer/in:
Dr. Susanne Seitz
Prof. Dr. Hanspeter Herzel

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Mammakarzinom | 1 |
| 1.2 Prognosefaktoren beim MC | 4 |
| 1.3 Krebsentstehung | 4 |
| 1.2.1 Onkogene | 6 |
| 1.2.2 Mutatorgene | 6 |
| 1.2.3 Tumorsuppressorgene | 6 |
| 1.4 LOH in Krebs | 9 |
| 1.5 Arbeitshypothese: Kopplung von mikrozellvermitteltem Chromosomentransfer und Genexpressionsanalyse als Strategie zur Identifizierung von Kandidatengen | 10 |
| 1.6 Microarrays | 11 |
| 1.7 FEZ1/LZTS1 (Leucin-Zipper-Tumorsuppressor 1) | 12 |
| 1.8 Aufgabenstellung | 13 |
| | |
| 2. Material | 14 |
| 2.1 Chemikalien | 14 |
| 2.2 Geräte | 15 |
| 2.3 Verwendete Enzyme und Kits | 15 |
| 2.4 Lösungen und Puffer | 16 |
| 2.4.1 Silberfärbung | 19 |
| 2.5 verwendete Primer | 20 |
| 2.6 Internet Datenbanken | 21 |
| 2.6.1 National Center for Biotechnology Information (NCBI) | 21 |
| 2.6.2 GenBank | 21 |
| 2.6.3 PubMed (Literaturecherche) | 21 |
| 2.6.4 LocusLink | 21 |
| 2.6.5 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) | 22 |
| 2.6.6 Public SNP database (dbSNP) | 22 |
| 2.6.7 GeneLynx | 22 |
| 2.7 Proben | 22 |
| 2.7.1 Probe set 1 | 22 |
| 2.7.2 Probe set 2 | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Methoden | 23 |
| 3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) | 23 |
| 3.2 Isolierung totaler RNA mit Trizol | 25 |
| 3.3 RNA-Probenvorbereitung für Gellauf | 25 |
| 3.4 RNA-Messung am Spektralphotometer | 25 |
| 3.5 RNA-Aufarbeitung und cRNA-Herstellung für die Chiphybridisierung | 25 |
| 3.6 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) | 27 |
| 3.7 Quantitative RT-PCR | 27 |
| 3.8 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut mittels QIAamp Blood Midi Kit | 27 |
| 3.9 DNA-Messung am Spektralphotometer | 28 |
| 3.10 SSCP (single strand conformation polymorphism) | 28 |
| 3.10.1 Probenvorbereitung | 28 |
| 3.10.2 Ermittlung der optimalen Laufbedingungen | 29 |
| 3.10.3 Durchführung der SSCP-Läufe | 29 |
| 3.11 Silberfärbung | 30 |
| 3.12 Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Purificationkit von Quiagen | 31 |
| 3.13 Sequenzierung | 30 |
| 3.13.1 Ethanol-Fällung | 31 |
| 3.13.2 Beladen des Sequenziergels und Gellauf | 32 |
| 3.14 Statistische Auswertung der Ergebnisse | 32 |
| | |
| 4. Ergebnisse | 33 |
| 4.1 Microarray-Hybridisierung | 33 |
| 4.2 Die Kandidatengene | 35 |
| 4.2.1 N33 | 37 |
| 4.2.2 PDGFRL | 37 |
| 4.2.3 KIA0062 | 37 |
| 4.2.4 FZD3 | 38 |
| 4.2.5 C8orf4 | 38 |
| 4.2.6 FGFR1 | 38 |
| 4.2.7 IKBKB | 38 |
| 4.2.8 PLAT | 39 |
| 4.2.9 LZTS1 | 39 |
| 4.3 Expression der Kandidatengene in Mammatumoren | 39 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.4 | Mutationsanalyse von LZTS1 | 43 |
| 4.4.1 | Auswahl der zu untersuchenden Bereiche des LZTS1 Gens | 44 |
| 4.4.2 | Mutationsanalyse LZTS1 | 44 |
| 4.4.2.1 | Fragment Ex1/2 | 46 |
| 4.4.2.2 | Fragment Ex3/2 | 47 |
| 4.4.2.3 | Fragment Ex2/1 | 48 |
| 4.4.2.4 | Fragment Ex2/3 | 49 |
| 4.4.2.5 | Veränderungen im Intron 2 | 51 |
| 4.4.2.5.1 | Fragment In2/1 | 51 |
| 4.4.2.5.2 | Fragment In2/2 | 53 |
| 4.4.2.5.3 | Fragment In2/3 | 55 |
| 4.4.3 | statistische Signifikanzen in Probe set 1 | 56 |
| 4.4.4 | statistische Signifikanzen von sub[2322+1216] G → A und sub[5544-257] A → T in Probe set 2 | 57 |
| 4.4.5 | Fragment In2/3 von T208 | 59 |
| 5. | Diskussion | 61 |
| 5.1 | Die Suche nach Mammakarzinom relevanten Genen | 61 |
| 5.2 | Array-Ergebnisse | 62 |
| 5.3 | LZTS1 als Kandidatengen | 63 |
| 5.3.1 | Mutationsscreening des LZTS1 Gens mittels SSCP | 63 |
| 5.3.2 | Sequenzveränderungen im LZTS1 Gen | 64 |
| 5.3.2.1 | Fragment In2/3 von T208 | 66 |
| 5.4 | LZTS1 als mögliches „Modifier“-Gen | 67 |
| 5.5 | Die anderen Kandidatengene auf 8p | 73 |
| 5.6 | Andere putative TSGs auf 8p | 74 |
| 5.7 | Ausblick für weiterführende Studien | 75 |
| | Zusammenfassung | 77 |
| | Literaturverzeichnis | 79 |
| | Danksagung | 87 |
| | Erklärung | 88 |

Anhang**89**

| | |
|--|----|
| Tab. 28 : Angaben zur Verteilung der über- und unterexprimierten Gene in CT65-1/1 V1 im Vergleich zu Cal51 V1 | 90 |
| Tab. 29: Angaben zur Verteilung der über- und unterexprimierten Gene in CT65-1/1 V2 im Vergleich zu Cal51 V2 | 91 |
| Tab. 30: Angaben zur Verteilung der über- und unterexprimierten Gene in CT65-1/1 V1&V2 im Vergleich zu Cal51 V1&V2 | 92 |
| Referenzsequenz (AC025853) 10750 bp DNA | 93 |