

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin C
(kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Christian Schmidt)
der Universitätsmedizin Greifswald

**Einzelnukeotid-Variationen in Genen der DNA-
Reparaturmechanismen bei Sézary Syndrom**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
Greifswald
2019

vorgelegt von: Andrzej Plis

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich (stellv. wissenschaftlicher Vorstand)

1. Gutachter: PD Dr. med. Carsten Hirt

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Philipp le Coutre

Ort, Raum: Raum J.0.37 [Seminarraum Innere Medizin C]

Tag der Disputation: 09.06.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	S. 5
1. 1 Einleitung	
1.1 Der Zellzyklus und seine Regulation	S. 7
1.2 DNA-Schädigung	S. 8
1.2.1 Endogene DNA-Schädigungen	S. 8
1.2.2 Exogene DNA-Schädigungen	S. 9
1.3 DNA-Reparatur	S. 11
1.3.1 Basen-Exzisionsreparatur (BER)	S. 12
1.3.2 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)	S. 14
1.3.3 Mismatch Reparatur (MMR)	S. 16
1.3.4 Reparatur von Doppelstrangbrüchen	S. 18
1.3.5 Homologe Rekombination (HR)	S. 19
1.3.6 Non-Homologous End Joining (NHEJ)	S. 21
1.4 Sézary Syndrom	S. 24
1.4.1 Pathogenese	S. 24
1.4.2 Klinische Symptomatik und Diagnostik	S. 25
1.4.3 Therapie	S. 26
2. Zielstellung	S. 28
3. Materialien	
3.1 Verbrauchsmaterial	S. 29
3.2 Chemikalien	S. 29
3.3 Molekularbiologische Produkte	S. 30
3.4 Lösungen und Puffer	S. 31
3.5 Geräte	S. 31
3.6 Software und Internetbanken	S. 32
3.7 Statistisk	S. 32
4. Methoden	
4.1 Sequenzierung der DNA von Patienten mit Sézary Syndrom	S. 33
4.2 Gewinnung der DNA von Kontrollprobanden	S. 33
4.2.1 Isolation von Lymphozyten	S. 33
4.2.2 Gewinnung der genomischen DNA (gDNA)	S. 34

4.2.3 Gewinnung der komplementären DNA (cDNA)	S. 34
4.2.4 Amplifizierung der DNA von Kontrollprobanden	S. 35
4.3 Agarose-Gelelektrophorese	S. 37
4.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegel	S. 37
4.5 Sequenzierung von DNA	S. 38
5. Ergebnisse	
5.1 Liste von ausgewählten Genen	S. 39
5.2 Durchsuchen von Genen auf SNVs mittels <i>Integrative Genomics Viewer</i>	S. 43
5.3 SNVs bei Patienten	S. 58
5.4 SNVs bei DNA-Reparaturmechanismen	S. 61
5.5 Amplifizierung der DNA von gesunden Spendern	S. 63
5.6 Sequenzierung der DNA von gesunden Spendern	S. 63
6. Diskussion	S. 65
6.1 SNVs in ausgewählten Genen	S. 66
6.2 Auswirkung von SNV auf Proteinfunktion	S. 73
6.3 Nukleotid-Veränderungen	S. 75
6.4 Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Patienten	S. 75
6.5 Häufigkeit von betroffenen DNA-Reparaturwegen	S. 75
7. Zusammenfassung	S. 77
8. Literaturverzeichnis	S. 78
9. Tabellenverzeichnis	S. 91
10. Abbildungsverzeichnis	S. 92
Eidesstattliche Erklärung	S. 93
Danksagung	S. 94

Abkürzungsverzeichnis

·O ₂ -	Hyperoxid-Anion
·OH	Hydroxyl-Radikal
APC	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen-Exzisionsreparatur
CLIPi	<i>cutaneous lymphoma international prognostic index</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
DSB	<i>double-strand break</i> , Doppelstrangbruch der DNA
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Fe	Eisen
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HTLV1/2	humanes T-lymphotropes Virus 1/2
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HR	homologe Rekombination
ICL	<i>interstrand crosslinks</i>
IL	Interleukin
IFN	Interferon
kbp	Kilobasenpaar
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MF	Mycosis fungoides
MMEJ	<i>microhomology-mediated end joining</i> , Mikrohomologie-vermittelte Endverbindung
MMR	Mismatch-Reparatur
mtDNA	mitochondriale DNA
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i> , nicht-homologe Endverknüpfung

nsSNV	<i>non-synonymous single nucleotide variation/variant</i> , nicht-synonyme Einzelnukleotid-Variation/Variante
PI3	Phosphatidylinositol 3
PROVEAN	<i>Protein Variation Effect Analyzer (Software)</i>
PUVA	Psoralen plus Ultravioletstrahlung A
SéSy	Sézary Syndrom
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant (Software)</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
SNV	<i>single nucleotide variation/variant</i> , Einzelnukleotid-Variation/Variante
SSB	<i>single-strand break</i> , Einzelstrangbruch der DNA
ssDNA	Einzelstrang DNA
TCR	T-Zell Rezeptor
UV	Ultraviolettstrahlung

1. Einleitung

1.1 Der Zellzyklus und seine Regulation

Als Zellzyklus bezeichnet man eine Folge von Ereignissen, die zu einer Zellteilung führen. Diese bestehen in der Regel aus 2 Phasen: einer Interphase und der Mitose/Meiose. Die Interphase kann weiter in die Phase G1, in der unter anderem die für die Replikation gebrauchten Enzyme sowie Zellorganellen synthetisiert werden, in die Phase S, in der eine DNA-Replikation stattfindet sowie in die Phase G2, in der Proteine (vor allem Tubulin) entstehen, unterteilt werden. Die Phase M umfasst eine Zytokinese sowie eine Karyokinese. In der Phase G0 befinden sich Zellen, die stark differenziert sind, wie z. B. Nervenzellen oder Hepatozyten. Diese können bei Bedarf wieder zur G1-Phase zurückkehren (1).

Um den Ablauf des Zellzyklus zu kontrollieren, besitzen die Zellen einen speziellen Mechanismus, sogenannte „Checkpoints“ (Kontrollpunkte). Deren Aufgabe ist es, eine nächste Zellzyklus-Phase erst nach vollständigem Abschluss/Beendigung der vorangegangenen Zellzyklus-Phase einzuleiten. Das Ziel ist, dass eine Mutter- und Tochter-Zelle dieselbe DNA-Information aufweisen, sodass eine genomische Stabilität gewährleistet werden kann. Die Checkpoints können durch Stress, Replikationsfehler, DNA-Schäden oder chromosomale Fehlverteilung während der Mitose/Meiose aktiviert werden. Dies kann zur Apoptose oder zur unkontrollierten Proliferation und Tumorgenese führen. Zu den Checkpoints-Proteinen gehören Sensor-Proteine, die eine DNA-Schädigung erkennen, Wandler-Proteine, vor allem Kinasen, die durch Phosphorylierung Signale und deren Übermittlung beschleunigen sowie Effektor-Proteine, die einen Progress des Zellzyklus verhindern (2).

Der Tumorsuppressor p53 spielt eine Hauptrolle bei allen Checkpoints. Er integriert Signale aus verschiedenen Signalwegen infolge von unter anderem DNA-Schädigung, Hypoxie sowie Aktivierung von Onkogenen (3). Eine p53 getriggerte Transkription führt zu einer Regulation, Bindung und Inhibition von Cyklin-abhängigen Kinasen, Zellzyklus-Arrest, zellulären Seneszensprogramm, Zell-Differenzierung, Apoptose sowie Angiogenese-Inhibition (3). Überdies ist p53 ein wichtiger Teil der DNA-Reparatur. Sein Target p21 bindet an PCNA, wodurch die Replikation aber nicht NER blockiert wird. P53 bindet auch direkt an das Replikations-Protein RPA, den TF II-Komplex sowie an dsDNA und ssDNA, und verfügt über eine DNA-Reannealing-, End-Joining- und Exonuklease-Aktivität (4, 5). Interessant bleibt eine upstream-Regulation von p53. Hierbei wurde als negativer Hauptregulator ein

Mdm2-Onkoprotein identifiziert (6). Zu einem anderen negativen Regulator von p53 gehört ebenfalls das CARF-Protein, das an einer Proteasomen-Degradation von p53 beteiligt ist (7). Sowohl als negativer (verhindert eine Bindung zu DNA-geschädigten Stellen) als auch als positiver (Funktion der Stabilisierung) p53-Regulator gilt das TIRR-Protein (8, 9).

Insgesamt wurden bereits viele Checkpoint-Signalwege entdeckt. Zu den wichtigsten kontrollierten Ereignissen des Zellzyklus gehören: Kontrolle der Zellgröße, Reaktion auf eine DNA-Schädigung, Monitoring der Replikation (S-Phase), G2/M-Übergang, Spindelapparat-Checkpoint (10).

1.2 DNA-Schädigung

Alle Biomoleküle unterliegen einer Schädigung durch endogene sowie exogene Faktoren (11). Da die DNA als eine Datenbank der genetischen Informationen gilt, spielt ihre Schädigung eine besondere Rolle. Entstehende Schädigungen können zu Seneszens, Mutationen und infolgedessen Erkrankungen, unter anderem Krebserkrankungen, führen. Zu dieser Gruppe von Erkrankungen gehören einige neurologische Erkrankungen, mit einem erhöhten Krebsrisiko verbundene sowie hämatologische Krankheiten (z. B. Xeroderma pigmentosum, Fanconi Anämie, Ataxia Teleangiectasia). Des Weiteren kann eine DNA-Schädigung zu einem vorübergehenden Zellzyklus-Arrest, während dessen eine Reparatur stattfinden könnte, oder zur Apoptose im Fall einer irreparablen DNA-Schädigung führen. Die Zellen entwickelten verschiedene Mechanismen der DNA-Reparatur als Reaktion auf DNA-Schädigungen (12). Es bestehen allerdings einige Unterschiede zwischen Prokaryonten und Eukaryonten (13).

1.2.1 Endogene DNA-Schädigungen

Der Großteil der DNA-Modifikationen hat eine endogene Ursache. 3×10^9 Basen werden in einer Zelle bei einer Replikation kopiert. An diesem Prozess sind Polymerasen mit hoher oder niedrigerer Genauigkeit („low-fidelity“) beteiligt. Dadurch entstehen Fehler (falsche Basensubstitution, Insertion, Deletion) mit einer Frequenz von 10^{-6} bis 10^{-8} pro Zelle pro Generation. Weitere endogene Schädigungen können durch Topoisomerasen verursacht werden.

Eine spontane Desaminierung von DNA-Basen ist die häufigste Ursache der Mutagenese in humanen Zellen. Sie tritt meistens bei Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA auf und betrifft vor allem Cytosin und 5-Methylcytosin. Durch diese Modifikation entsteht Uracil, Thymin,

Hypoxanthin und Xanthin. Dies führt zu weiteren Fehlern während der Replikation und Transkription. Wenn eine N-Glycosyl-Bindung in einem DNA-Strang spontan hydrolysiert oder durch Glykosylasen gespalten wird, entstehen dadurch sogenannte abasische Stellen. Diese werden meistens durch Endonukleasen und im Rahmen von BER repariert.

Reaktive Sauerstoffverbindungen ($\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$) entstehen vor allem infolge der zellulären Atmung bei aeroben Organismen. In kleinen Mengen spielen sie eine Rolle bei Redox-Reaktionen und sind ein Teil der Immunsystem-Reaktionen auf Pathogene. Das Hydroxyl-Radikal kann sich an DNA-Basen addieren sowie Elektronen von Zucker- oder Baseneinheiten abstrahieren. Des Weiteren können in einer Fenton-Reaktion ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}$) hochreaktive Hydroxyl-Radikale entstehen und eine Öffnung des Imidazol-Ringes in Guanin oder Adenin verursachen. Oxidierte Basen werden im Rahmen von BER oder Reparatur von SSB/DSB, falls es zu einem DNA-Bruch kommt, repariert.

Zu einer Methylierung von DNA-Basen kann es spontan durch S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferasen kommen. Das dadurch entstandene O4-Methylthymine und O4-Ethylthymine weist im Vergleich zum N3-Methylthymine und N3-Methylcystein ein hochmutagenes Potential auf und verursacht Transition-Mutationen. Methylierte Basen werden durch Ethylotransferasen, Oxygenasen oder Glykosylasen im Rahmen von BER oder MMR entfernt (14).

1.2.2 Exogene DNA-Schädigungen

Zu der ionisierenden Strahlung gehört eine alpha-, beta-, gamma-, Neutron- und X-Strahlung. Diese wird durch Felsen, Erde, Radon, kosmische Strahlung sowie medizinische Geräte produziert. Eine Wirkung von dieser kann direkt oder indirekt zu einer DNA-Schädigung führen. Die indirekte Wirkung hängt mit der Entstehung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (vor allem $\cdot\text{OH}$) zusammen. Infolge dessen können 8-oxo-Guanin, Thymin-Glykol oder Formamidopyrimidine entstehen. Durch eine direkte Wirkung der Strahlung kann es zu SSB mit einer charakteristischen Endung (3'-Phosphat oder 3'-Phosphoglykolat) sowie zu DSB kommen.

UV-Strahlung, die die häufigste Ursache der verschiedenen Arten von Kerbserkrankungen der Haut ist (15), kann abhängig von der Wellen-Länge in UV-C (190-290 nm), UV-B (290-320 nm) und UV-A (320-400 nm) unterteilt werden. Das Sonnenlicht besteht aus 5,1 % UV-A, 0,3% UV-B, 62,7% sichtbarem Licht und 31,9% infrarotem Licht. UV-C wird vorwiegend durch eine Ozonschicht gefiltert. Eine durch UV-Strahlung verursachte DNA-Schädigung

entsteht entweder durch direkte oder indirekte Absorption der Energie durch Moleküle, wobei UV-C-Strahlung sehr viel stärker im Vergleich zu UV-B/A durch DNA absorbiert wird. Dies verursacht eine Bildung von „bulky dimers“ (Cyclobutan-Pyrimidin Dimere, Pyrimidin-Pyrimidon Photoprodukte), die die DNA-Struktur verzerren. UV-B kann ebenfalls zur Bildung von Dimeren führen, allerdings nicht so häufig wie UV-C-Strahlung. UV-A bedingte DNA-Schädigungen entstehen durch Bildung von DNA-Addukten, Anregung von endogenen (Porphyrine, Flavine) und exogenen (Psoralen, Tetrazykline) Photosensitizern sowie Strangbrüche. Die UV-bedingten DNA-Schädigungen werden im Rahmen von NER, TLS („translesion DNA synthesis“) oder HR repariert.

Zu den DNA-schädigenden Chemikalien gehören Alkylanzien, die zum Beispiel in Tabakrauch zu finden sind; des Weiteren entstehen diese während der Verbrennung von Biomasse, industrieller Verarbeitung oder gehören zu Nahrungskomponenten. Die Alkylanzien reagieren mit einem Stickstoff, vor allem N7 von Guanin und N3 von Adenin und weniger mit Sauerstoff. Infolgedessen entstehen sogenannte „interstrand crosslinks“, bei denen zwei reaktive Gruppen mit zwei gegenüber liegenden Basen reagieren (16). Einige Alkylanzien werden in der Chemotherapie (z. B. Cyclophosphamid, Cisplatin) zur Behandlung von Krebserkrankungen verwendet. Ähnlich wie Alkylanzien kann auch Psoralen sowie Pyrimidin-Addukte nach der Photoaktivierung durch UV-A „interstrand crosslinks“ verursachen. Dies fand Anwendung in der Therapie von Psoriasis, Ekzemen sowie kutanen T-Zell Lymphomen. Die durch Alkylanzien verursachten DNA-Schädigungen werden durch direkte Reparatur, ICL-Reparatur sowie BER behoben.

Aromatische Amine (z. B. 2-Aminofluorene und sein Derivat N-Acetyl-2-Aminofluor) sind in Tabakrauch, Brennstoffen, Kohle und Farbstoffen enthalten oder entstehen beim Kochen mit hoher Temperatur. Nach der Aktivierung durch das P450-Monooxygenase System entstehen daraus karzinogene Alkylanzien, die vor allem C8 von Guanin „attackieren“. Dadurch wird die DNA-Struktur verändert, insbesondere wenn C8 in der kleinen Furche der DNA liegt. Diese Schädigung wird durch NER repariert.

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe zeichnen sich durch einen oder mehrere aromatische Ringe aus. Zu deren Quelle gehören Tabakrauch, Autoabgase und verkohltes Essen. Insbesondere das Dibenzo[*a,l*]pyren wirkt kanzerogen. Nach der Aktivierung durch P450 entstehen DNA-Addukte, die im Rahmen von BER oder NER repariert werden können.

Die DNA kann ebenso durch andere reaktive Elektrophile geschädigt werden. Dazu gehört Östrogen sowie im konservierten Fleisch oder im Tabakrauch enthaltene N-Nitrosamine.

Aflatoxine werden durch *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* produziert. Nach der Metabolisierung durch den P450-Komplex entsteht eine aktive Form, die mit N7 von Guanin reagiert, wodurch eine glykosidische Bindung schwächer wird und eine Depurinierung entsteht.

Zu weiteren DNA-schädigenden Faktoren gehört auch oxidativer Stress sowie einige Konservierungstoffe (Natrium-, Kalium-Benzoat, Kalium-Sorbat), Nahrungsmittelzusatzstoffe (Zitronensäure, Phosphorsäure) und Pflanzenschutzmittel (14).

1.3 DNA-Reparatur

Um die genomische Stabilität aufrecht zu erhalten, entwickelten Zellen im Laufe der Evolution als Reaktion auf eine DNA-Schädigung verschiedene DNA-Reparaturmechanismen in Abhängigkeit von der Art der DNA-Schädigung („DNA damage response“; „DDR“). Diese DDR charakterisiert eine zeitlich eng abgestimmte Aktivierung und Deaktivierung von Faktoren, die an der Erkennung, Überprüfung und Reparatur der Schädigung beteiligt sind. Diese Faktoren brauchen einen Zugang zur DNA, der durch Veränderungen der Chromatin-Struktur reguliert werden kann. Deswegen spielt eine Chromatin-Reorganisation sowie Dekondensation eine entscheidende Rolle nicht nur bei der DNA-Reparatur, sondern auch bei anderen zellulären Prozessen, wie Replikation oder Transkription. Solche Chromatin-Strukturveränderungen entstehen unter anderem durch Histon-Phosphorylierung oder Ubiquitinierung (17).

Bereits kleine, durch UV-Strahlung und Alkylierung verursachte DNA-Basenveränderungen, können mittels Alkyltransferasen (AGT/MGMT) und Dioxygenasen (AlkB-Homologe) in einem einfachen Weg repariert werden (14).

Zu den wichtigsten DNA-Reparaturmechanismen gehört eine Basen-Exzisionsreparatur, Nukleotid-Exzisionsreparatur, ein Mismatch-Reparatur-System sowie die Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels einer homologen Rekombination und nicht homologen Endverknüpfung („non-homologous end-joining“) (12).

1.3.1 Basen-Exzisionsreparatur (BER)

Eine Basen-Exzisionsreparatur ist ein konservierter Mechanismus, der für die Reparatur einer Mehrheit von endogenen, nukleären sowie mitochondrialen DNA-Schädigungen inklusive Alkylierung, Oxydierung, Desaminierung, Depurinierung sowie für die Reparatur von Einzelstrang-DNA-Schädigungen verantwortlich ist (18, 19). Bei diesem Prozess werden Zwischenprodukte „isoliert“ und in den nacheinander folgenden Schritten verwendet, sodass es nicht zu einem Zellzyklus-Arrest oder einer Apoptose kommt (20).

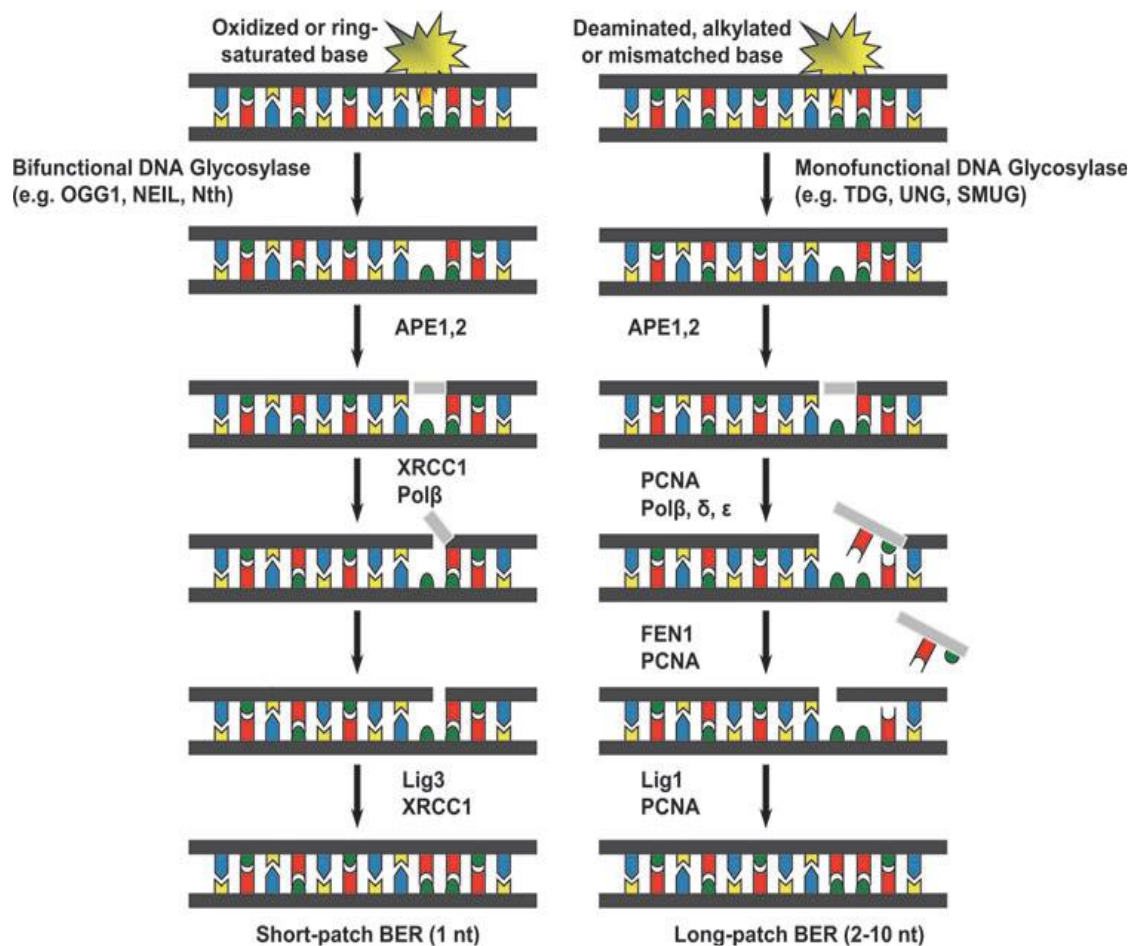
Eine beschädigte Base wird durch eine Glykosylase, die eine N-glykosidische Bindung zwischen dieser Base und einer Desoxyribose spaltet, entfernt. Es ist dabei wichtig, dass eine unbeschädigte Base zwar durch eine Glykosylase erkannt, aber nicht aus der DNA abgespalten wird (21). Infolge der Glykosylase-Wirkung entsteht eine abasische Stelle. Es wurden mindestens 12 Glykosylasen entdeckt; alle verwenden denselben Mechanismus, in dem eine Base zur Exzision in eine extrahelikale Position verschoben wird. Eine abasische Stelle wird durch eine apurinische/apyrimidinische Endonuklease (APE1) repariert. Diese hydrolisiert ein Phosphodiester-Backbone. Nach der Wirkung dieses Enzyms entsteht ein Einzelstrangbruch mit einer 3'-OH und 5'-Desoxyribose-Phosphat Endung. Einige Glykosylasen verfügen zusätzlich über eine Lyase-Aktivität. Diese Endungen werden im weiteren Verlauf entweder durch die Phosphodiesterase-Aktivität von APE1 oder die Lyase-Aktivität der DNA-Polymerase β entfernt. Zu anderen Enzymen, die entstehende blockierte DNA-Endungen reparieren können, gehört auch beispielsweise eine Tyrosyl-Phosphodiesterase, die für die Exzision von 3'-Phosphoglykolat (entsteht durch reaktive Sauerstoffverbindungen) zuständig ist oder Aprataxin. Die Reparatur der Endungen stellt sich insgesamt als ein mehrstufiger Prozess dar. Im weiteren Verlauf erfolgt eine DNA-Synthese und Ligation. Dieser Schritt verläuft abhängig von der Länge der ausgeschnittenen Basen entweder als kurzer („short-patch“) oder langer („long-patch“) Weg. Bei dem kurzen Weg, der bei 80-90% aller Basen-Exzisionsreparaturen verläuft, wird durch eine DNA-Polymerase β eine 5'-Desoxyribose-Phosphat Endung entfernt und das fehlende Nukleotid eingefügt. Eine Ligation erfolgt durch die DNA-Ligase I oder die DNA-Ligase III und den XRCC1 Komplex. Bei dem langen Weg ist eine Mitwirkung von anderen Polymerasen (δ oder ϵ), PCNA, RFC und FEN1 notwendig.

XRCC1 sowie PARP1 gehören zu den Helfer-Proteinen, die an der BER beteiligt sind. XRCC1 funktioniert als eine „Gerüst“ für andere Proteine und interagiert mit diesen (z. B. Glykosylasen, DNA- Polymerase β , APE1, Ligase III, PNKP, TDP1, APTX). PARP1 gilt als ein Sensor der DNA-Schädigung. Nach der Bindung an DNA werden andere Proteine, unter

anderem XRCC1 aktiviert. Nach der PARP1-Freisetzung von DNA können Reparatur-Proteine an die DNA gebunden werden (12).

Mutationen in Genen, die Enzyme des Basen-Exzisionsreparatur-Mechanismus kodieren (z. B. DNA-Glykosylase), sind mit Krebserkrankungen (Lymphome, Kolorektal-Karzinome), neurodegenerativen Erkrankungen, Wachstum-Anomalien, Immunsystem-Dysfunktionen sowie dem Altern assoziiert (22).

Abbildung 1 BER-Mechanismus (23)



BER kann als ein kurzer („short-patch“) oder langer („long-patch“) Weg verlaufen. Bei kurzem Weg wird eine Läsion durch ein Nukleotid ersetzt, bei langem Weg werden 2-10 Nukleotide eingebaut.

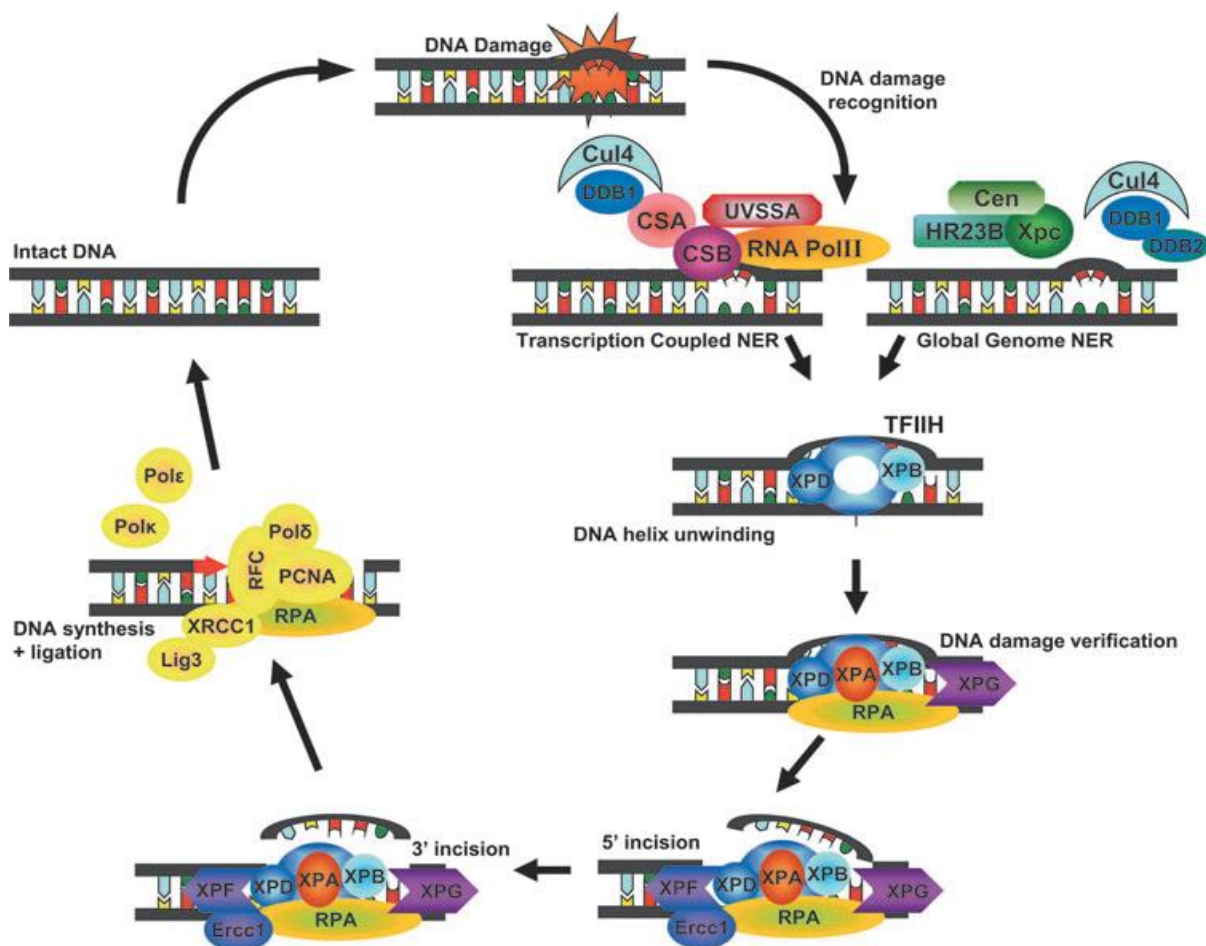
1.3.2 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Durch diesen Mechanismus werden „bulky lesions“, die die helikale Struktur der DNA verzerren, repariert. Im Rahmen von DNA-Veränderungen entstehen Pyrimidin-Dimere (Cyclobutan-Pyrimidin Dimere und 6-4 Photoproducte) vor allem durch eine UV-Schädigung oder als Folge der Cisplatin-Wirkung („intrastrand crosslinks“). Im Vergleich zur BER umfasst diese Reparatur ähnliche Schritte wie die Erkennung von Läsionen, das Öffnen der DNA-Helix, die Exzision, Synthese eines fehlenden Fragments sowie Ligation; allerdings erfordert NER die zeitlich koordinierte Aktion von sehr vielen Proteinen (über 30). Die NER umfasst 2 Wege: „global genome repair“ (GG-NER) und „transcription-coupled repair“ (TC-NER); bei Letzterem werden vor allem Schädigungen der DNA im Bereich aktiv transkribierter Genen repariert (24). Ein Unterschied zwischen diesen zwei Wegen besteht in der Erkennung von Läsionen. Bei der GG-NER ist bei größeren DNA-Verzerrungen ein XPC/RAD23B/CETN2 und bei kleineren Verzerrungen ein DDB1/XPE (DDB2)-Protein Komplex für die Erkennung verantwortlich. Die Bindung des DDB2-Komplexes an die DNA erhöht die DNA-Verzerrung, sodass XPC rekrutiert wird. Bei der TC-NER wird bei einer DNA-Schädigung eine RNA-Polymerase II nach der Anlagerung an einer geschädigten Stelle aktiviert. Einige Läsionen können durch GG-NER erkannt, aber durch TC-NER repariert werden. Der Grund liegt wahrscheinlich darin, dass kleinere Schädigungen keine signifikanten DNA-Verzerrungen verursachen. Im weiteren Schritt verdrängen die zwei Proteine CSA und CSB die RNA-Polymerase, wodurch andere Reparatur-Proteine den Zugriff auf die DNA erhalten. Weitere Schritte verlaufen bei GG- und TC-NER als ein gemeinsamer Weg ab. Durch XPC oder CSB und CSA wird ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor TFIIH aktiviert. Daraufhin bewirken die ATP-abhängigen DNA-Helikasen XPB und XPD ein asymmetrisches Abwickeln der DNA-Helix von ca. 30 Nukleotiden. Dies erlaubt einen Zugriff von XPA, RPA und XPG auf die DNA. Infolgedessen erfolgt eine weitere Dehnung der DNA und Stabilisierung des ganzen Komplexes („preincision complex“). Im weiteren Schritt werden Nukleotide durch XPG und XPF/ERCC1 Endonukleasen geschnitten. Am ehesten erfolgen die Schnitte nicht gleichzeitig, sondern nacheinander. Dadurch wird eine Exposition von unauffälliger ssDNA, die instabiler im Vergleich zu „bulky lesions“ wirkt, verhindert. Des Weiteren kann der Übergang von der Exzision zur Synthese besser reguliert werden. Die DNA-Polymerase δ , κ oder ϵ synthetisiert ein fehlendes DNA-Fragment; hierfür wird ein unauffälliger DNA-Strang als Muster benutzt. Eine Rekrutierung der Polymerase κ hängt von RAD18 und der PCNA-Ubiquitinierung ab. Die DNA-Synthese kann bereits vor dem Exzisions-Schritt erfolgen und umfasst etwas mehr

als die Hälfte der NER-Reparaturzeit in Anwesenheit der inaktiven XPG. Die Blockung der DNA-Polymerase kann ähnlich wie bei der Replikation nach dem Eintreffen der DNA-Schädigung verlaufen. Am Ende wird der Prozess durch eine DNA-Ligase III α oder I vervollständigt (12, 25, 26).

Defekte des NER-Mechanismus wurden bei der Xeroderma pigmentosum, dem Cockayne Syndrom und der Trichothiodystrophie nachgewiesen. Diese Erkrankungen zeichnen sich durch eine hohe Sensivität auf Sonnenlicht, ein erhöhtes Risiko an Krebserkrankungen, Neurodegeneration, vorzeitiges Altern, Wachstumsverzögerung sowie immunologische Defekte aus (27-30).

Abbildung 2 NER-Mechanismus (23)



Die NER umfasst 2 Wege: „global genome repair“ (GG-NER) und „transcription-coupled repair“ (TC-NER). Nach der Erkennung der Läsion verlaufen weitere Schritte (Öffnen der DNA-Helix, Exzision, Synthese eines fehlenden Fragments, Ligation) als gemeinsamer Weg ab.

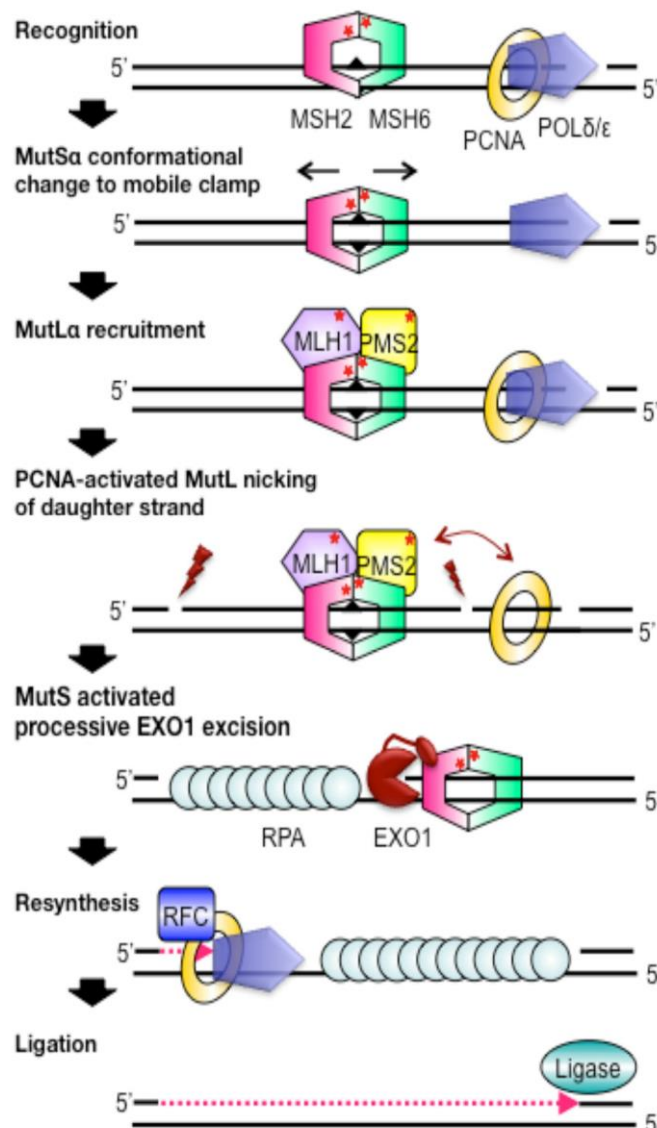
1.3.3 Mismatch Reparatur (MMR)

Die Mismatch Reparatur spielt eine Hauptrolle bei der post-Replikations Reparatur, bei der durch eine Polymerase falsch eingefügte Basen ersetzt werden. Des Weiteren sind MMR-Proteine an der Reparatur von „insertion/deletion loops“ (IDLs) zuständig, die nach „Verrutschen“ der Polymerase bei einer Replikation von repetitiven DNA-Sequenzen entstehen. Die MMR-Reparatur ist ein konservierter Prozess und umfasst die Erkennung einer DNA-Schädigung, die Exzision sowie die Synthese des fehlenden DNA-Fragmentes. Die Erkennung erfolgt durch folgende zwei Proteinkomplexe: MutS und MutL, wobei durch MutS die Erkennung nicht komplementärer Basen erfolgt, während durch MutL die Rekrutierung weiterer Proteine stattfindet. MutS funktioniert als ein Heterodimer und besteht sowohl aus MutS α (MSH2/MSH6), der Mismatches und kleine IDLs erkennt als auch aus MutS β (MSH2/MSH3), der längere IDLs erkennt. Nach der Bildung eines MutS-DNA Komplexes erfolgt eine ATP-abhängige Aktivierung von MLH (MutL Homolog). Dieser besteht ebenfalls aus Heterodimer-Komplexen: MutL α (MLH1/PMS2), der für 90% der Komplex-Aktivität verantwortlich ist und eine durch MutS α und MutS β eingeleitete Reparatur unterstützt, MutL β (MLH1/PMS1) sowie MutL γ (MLH1/MLH3). Der Abbau eines fehlerhaften DNA-Stranges erfolgt mittels der Exonuklease 1 (EXO1), die über eine 5' zu 3'-Exonuklease-Aktivität verfügt. Ihr Ansatzpunkt an der DNA kann bis 1 kbp von der Mismatch-Stelle entfernt sein und entsteht über eine ssDNA-Inzision im Rahmen der Endonuklease-PCNA/Replikationsfaktor C-abhängigen Aktivität von MutL α . Eine 5' und 3'-Exzisionsreaktion benötigt unterschiedliche Komponenten, aber beide beginnen mit einer Bindung von MutS an DNA. Bei einer 5'-Exzision stabilisiert MutS EXO1, sodass eine Exonuklease-Aktivität nur im Rahmen des Komplexes vorhanden ist und durch RPA inhibiert wird. Bei einer 3'-Exzision interagiert MutL α mit MutS sowie PCNA und verursacht multiple DNA Spaltungen zwischen einer 3'-Endung bis zu einer sich direkt nach dem Mismatch befindenden Stelle. MutL α kann durch eine Proteasom-abhängige Degradation von PMS2 reguliert werden. Eine DNA-Lücke wird durch die Polymerase δ mit Beteiligung von PCNA und RPA synthetisiert. Die verbliebene Kerbe wird durch die Ligase I entfernt (12, 31, 32).

Zellen mit einem gestörten MMR-Mechanismus sind gekennzeichnet durch eine Mikrosatelliteninstabilität und erhöhte Mutationsraten. Störungen treten bei einem MMR-Protein Mangel (meistens durch epigenetisches Silencing bei Hypermethylierung) auf. Keimbahnmutationen von MMR-Genen sind mit einer Neigung zur Entwicklung von Krebserkrankungen wie dem Lynch Syndrom (autosomal-dominant vererbte vor allem MSH2

und MLH1 Mutationen) verbunden. Bei diesem Syndrom ist nicht nur das Risiko zur Entwicklung von Kolonkarzinom, sondern auch von Endometrium-, Magen-, Ovarial-, Dünndarm-, Nieren-, Urether-, Harnblase-, Pankreas-, Talgdrüse- (Muirr-Torre Syndrom), Mamma- und Prostata-Karzinomen sowie Sarkomen erhöht (33-36).

Abbildung 3 MMR-Mechanismus (37)



Bei MMR erfolgt die Erkennung von DNA-Schädigungen durch zwei Proteine: MutS (MSH2 + MSH6) und MutL. Nach der Bildung eines MutS-DNA Komplexes wird MutL Homolog aktiviert. Daraufhin erfolgt eine Zersetzung eines DNA-Stranges mittels einer Exonuklease 1 (EXO1). Die fehlende DNA wird durch die Polymerase δ mit Beteiligung von PCNA und RPA synthetisiert.

1.3.4 Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Doppelstrangbrüche gelten als besonders gefährliche DNA-Schädigungen in Bezug auf das Zell-Überleben. Diese entstehen durch eine Wirkung von ionisierender Strahlung, entweder indirekt, wenn durch einen Einzelstrangbruch oder eine Basen-Schädigung eine Replikationsgabel geblockt wird oder wenn eine Replikationsgabel-Regression mit Entstehung von sogenannten „chicken foot“-Strukturen stattfindet. Ein einziger, nicht reparierter Doppelstrangbruch kann zur Apoptose führen (38, 39). Die zwei Hauptmechanismen, die für eine Reparatur von solchen Schädigungen verantwortlich sind, umfassen eine homologe Reparatur (HR) und nicht homologe Endverbindung („non-homologous end-joining“, NHEJ). NHEJ funktioniert in allen Phasen des Zellzykluses außer der M-Phase. Die HR wird nur nach der Replikation in der S/G2 Phase aktiviert.

Die Struktur von DSB spielt eine weitere Rolle bei der Wahl des Reparaturmechanismus. „One-ended“ DSBs, die während einer Replikation entstehen können, werden in der S-Phase vor allem durch HR repariert, da ein Partner-DSB für NHEJ fehlt. In diesem Fall bindet ein Ku/PKcs Komplex an die DNA, wodurch PKcs aktiviert wird. Durch die MRE11-Endonuklease-Aktivität entsteht eine Kerbe um DSB-Endungen herum. Im weiteren Schritt wird eine EXO1/DNA2-Exonuklease aktiviert. Im Endeffekt wird eine ssDNA für HR gebildet. „Two-ended“-DSBs, die überwiegend durch eine ionisierende Strahlung entstehen, werden entweder in einer G2 Phase durch HR oder NHEJ behoben. Mittels NHEJ werden ca. 70% und mittels HR ca. 30% von solchen DSBs repariert. Die Reparatur verläuft als HR, wenn DSBs eine komplexe DNA-Endung- oder Chromatin-Struktur sowie Transkription-aktive Stellen enthalten. In diesem Fall wird Ku70/80 durch eine RNF138-abhängige Ubiquitinierung und MRE11-Nuklease-abhängige Digestion entfernt. Weitere Schritte verlaufen ähnlich wie die Reparatur von „one-ended“-DSBs. Diskutiert wird auch eine weitere Regulation durch BRCA1 und 53BP1. 53BP1 wird zu den DSB-Endungen rekrutiert. Nach der Phosphorylierung durch ATM ist eine Interaktion mit RIF1 möglich. Infolgedessen wird eine 53BP1-Repositionierung verhindert. Durch eine Bindung zu Chromatin kommt es zur ihrer Verdichtung, so dass DNA-Nukleasen geblockt werden. Dies führt zur NHEJ-Reparatur. Nach einer Dephosphorylierung von 53BP1 durch Phosphatasen (z. B. PP4c), die durch BRCA1 gefördert werden, erfolgt eine UHRF1-abhängige Ubiquitinierung von RIF1 und seine Freisetzung aus dem Komplex. Dadurch kann 53BP1 repositioniert werden. Infolgedessen kann HR mit Wirkung von EXO1 stattfinden (40, 41).

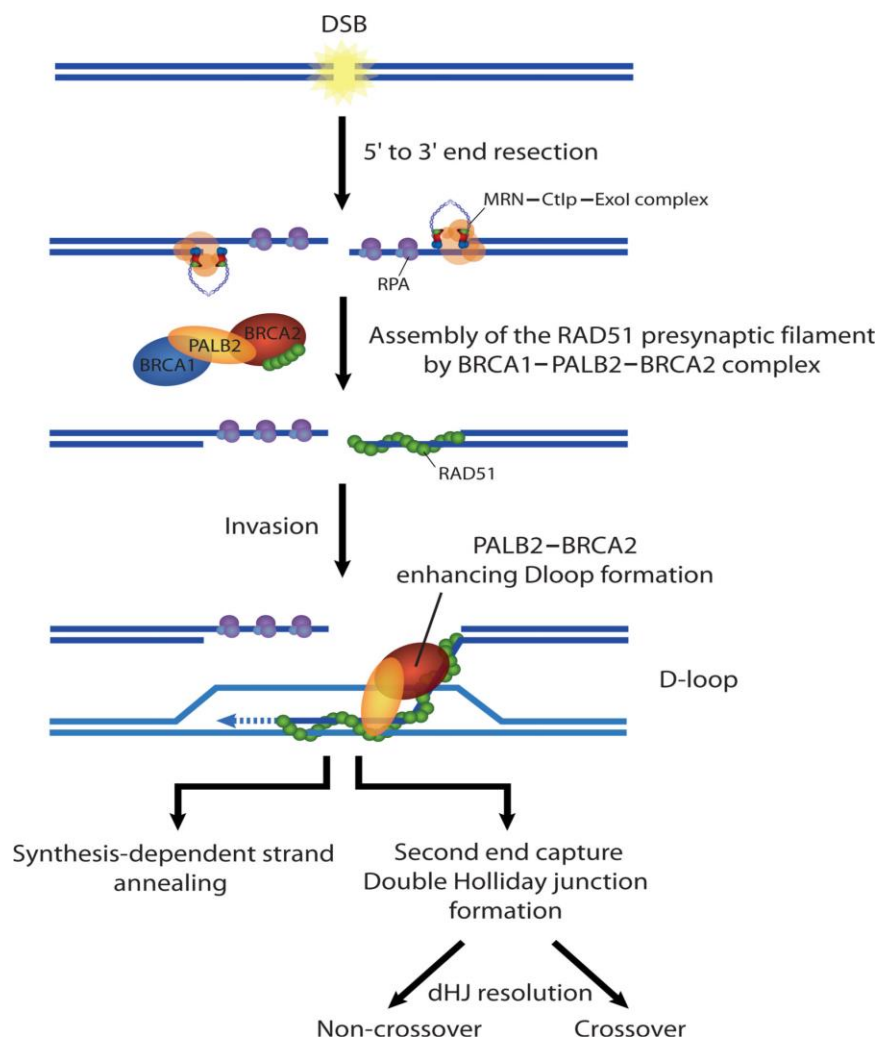
1.3.5 Homologe Rekombination (HR)

Diese Reparatur kann als ein „Schutzweg“ einer Replikationsgabel-Progression betrachtet werden, da somit eine genaue Chromosomen-Duplikation gewährleistet werden kann. Durch eine HR-Reparatur werden ssDNA-Lücken, die nach einem Durchgang von einer Replikationsgabel über eine beschädigte DNA-Stelle entstehen, verschlossen. Die Reparatur wird durch eine 5´ zu 3´ Einzelstrang Resektion von DSBs Endungen initiiert (präsynaptische Phase). Dafür ist ein MRN (MRE11-RAD50-NBS1)-Komplex mit CtIP (RBBP8) verantwortlich. BRCA1 interagiert direkt mit CtIP, sodass eine phosphorylierte Form an DSB-Stellen gebunden wird. Ein weiterer Schritt der Resektion erfolgt mittels einer BLM-Helikase und EXO1 Exonuklease. Infolgedessen entstehen kurze 3´-Überhänge von ssDNA, die von RPA gebunden werden. RPA wird durch RAD51 in Verbindung mit anderen Proteinen wie RAD52, RAD54, BRCA2 oder RAD51-Paralog-Proteine (RAD51B/C/D, XRCC2, XRCC3) ersetzt, wodurch ein Nukleoprotein-Filament entsteht. BRCA1 fördert durch PALB2 eine BRCA2-Rekrutierung. Dies ermöglicht eine ssDNA-RAD51 Interaktion. RAD52 stimuliert eine Polymerisierung von RAD51, wobei RAD54 den DNA-Protein-Komplex stabilisiert und die Entstehung von einer Heteroduplex-Struktur fördert. Interessanterweise kann RAD51 ebenso zur DNA-Schädigung durch Beteiligung an der Entstehung von DNA-RNA Hybriden (R-Loops) führen. Dieses Protein wird bei Hefen durch Srs2 von ssDNA entfernt. Bei Säugetieren gestaltet sich ein RAD51-Regulationsmechanismus komplexer. Als potentielle Srs2-Homolog-Proteine wurden FBH1, RTE und RECQL5 identifiziert. Im weiteren Verlauf, nach der Identifizierung eines homologen DNA-Stranges (z. B. aus einem Schwester-Chromatid) vermittelt RAD51 eine Strang-Invasionsreaktion (synaptische Phase). Bei dieser legt sich ein beschädigter DNA-Strang an ein DNA-Template an. Eine DNA-Synthese von einem 3´-Ende erfolgt durch eine Polymerase η und eine Ligation durch eine Ligase I (postsynaptische Phase). Eine „holliday junction“ wird durch einen BLM-TopIII α -Komplex gelöst. Dies erfolgt entweder durch eine symmetrische Spaltung durch GEN1/YEN1 oder SLX1/4, oder asymmetrische Spaltung durch eine Endonuklease MUS81/EME1 (12, 42-46).

Bei allen Organismen mit mangelhafter HR-Reparatur zeichnen sich Zellen durch eine hohe Rate von Mutationen aus, die entweder spontan oder durch exogene Faktoren entstehen. Die Mehrheit der Mutationen, die mit einem familiären Brust- oder Ovarialkarzinom verbunden sind, betreffen einen HR-Mechanismus. Zu den betroffenen Genen gehören BRCA1/2 und die AKT1 Kinase. Eine HR-Hemmung durch eine Bcl-2 Überexpression und somit Relokalisierung von BRCA1 in Endomembranen wurde bei Lymphomen nachgewiesen.

Eine verminderte Expression von RAD51 und XRCC2 hängt mit einem MDS-Progress zusammen. Eine Inaktivierung vom BLM Protein ist mit dem Bloom-Syndrom (Wachstumsverzögerung, Immunschwäche, Entwicklung von verschiedenen Tumoren) verbunden. Eine Resistenz von BCR/ABL-positiven Krebserkrankungen (CML) gegen Medikamenten-bedingte DNA-Schädigungen kann durch einen erhöhten intrazellulären Spiegel von RAD51 erklärt werden (46-49).

Abbildung 4 HR-Mechanismus (46)



Homologe Rekombination besteht aus einer präsynaptischen (5' zu 3' Einzelstrang-Resektion durch MRN-Komplex, CtIP, BLM, EXO1), synaptischen (durch RAD51-vermittelte Strang-Invagination Reaktion) und postsynaptischen (DNA-Synthese durch Polymerase η und Ligation durch Ligase I) Phase.

1.3.6 Non-Homologous End Joining (NHEJ)

Grundsätzlich wird dieser Mechanismus bei DSB-Reparaturen bevorzugt, wobei es zwischen einem klassischen (cNHEJ) und alternativen NHEJ (alt-NHEJ) unterschieden werden muss.

Bei cNHEJ werden am Anfang DSB-Endungen der DNA durch ein Ku70/Ku80 Heterodimer (Ku) erkannt. Dieser kreist diese ein und rekrutiert eine katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PKcs), sowie einen XLF, XRCC4-DNA Ligase IV-Komplex. XRCC4 gilt als ein „Gerüst“ für NHEJ-Proteine und interagiert mit Proteinen inklusive PNKP, APTX und APLF, die für die Verarbeitung von DNA-Endungen verantwortlich sind. Im weiteren Schritt erfolgt eine Translokation von Ku, was eine Interaktion von DNA-PKcs und Exonukleasen mit DNA-Endungen ermöglicht. Es ist auch möglich, dass Ku dynamisch an DNA gebunden und davon gelöst werden kann. Durch die Bindung von DNA-PKcs an die gegenüber liegende DSB-Endung und eine Autophosphorylierung von DNA-PKcs entsteht eine stabile Synapse. Da für die Wirkung der DNA-Ligase IV 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Endungen der DNA erforderlich sind, müssen DNA-Überhänge entsprechend „angepasst“ werden. Dieses erfolgt mittels Proteinen, die durch XRCC4 rekrutiert werden. XRCC4 wird durch die Kinase CK2 phosphoryliert. Infolgedessen kann an der DNA PNKP, APTX, APLF gebunden werden. Insbesondere scheint eine PNKP-Wirkung für NHEJ kritisch zu sein. Dieses Protein verfügt über eine 3'-Phosphatase- und 5'-DNA-Kinase-Aktivität, die durch XRCC1 und XRCC4 (vor allem durch einen gesteigerten Substratumsatz) stimuliert werden kann. Eine NHEJ-spezifische Nuklease Artemis verfügt über eine DNA-PKcs unabhängige 5' zu 3' Exonuklease-sowie eine DNA-PKcs-abhängige Endonuklease-Aktivität, wodurch Einzelstrangüberhänge entfernt werden können. Des Weiteren sind bei der „Reparatur“ von Überhängen auch andere BER-spezifische Enzyme wie APE1, TDP1 sowie Exonukleasen wie EXO1 und WRN involviert. Eine Synthese von fehlenden Nukleotiden erfolgt durch eine Polymerase μ und λ . Eine Ligation der DNA-Endungen erfolgt durch eine Ligase IV in Verbindung mit XRCC4 und XLF.

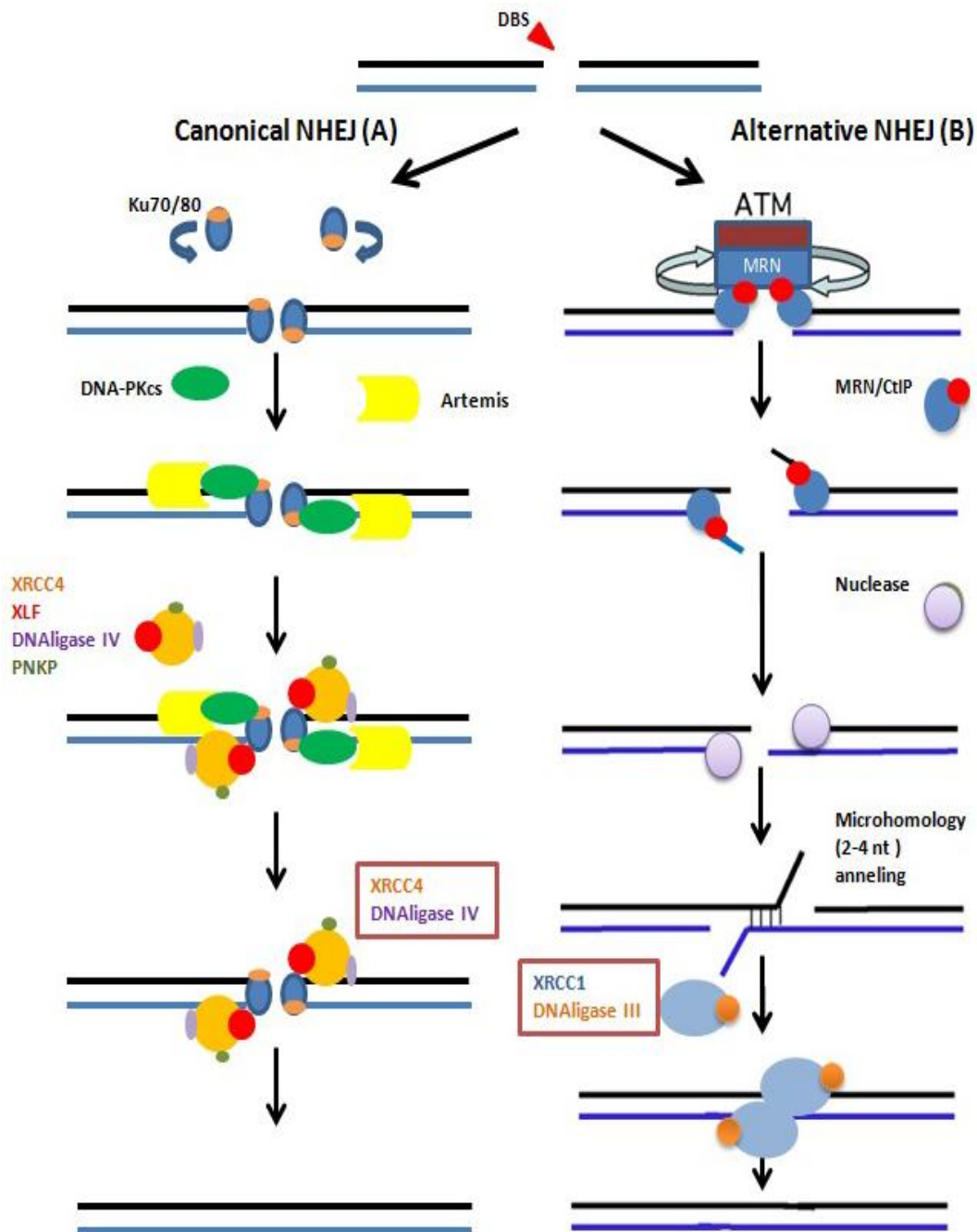
Zu einem alternativen NHEJ gehört microhomology-mediated end joining (MMEJ). Dieser Reparatur-Mechanismus ist besonders bei Zellen mit beeinträchtigtem BER-, HR- oder cNHEJ-Mechanismus aktiv und wird in S/G2-Phase bevorzugt. MMEJ besteht aus 3 Schritten. Beim Pre-Annealing bindet PARP1 an DSB-Endungen, was eine Rekrutierung von Resektionsfaktoren wie CtIP sowie des MRN-Komplexes mit einer 3' zu 5'-Exonuklease-Aktivität ermöglicht. Eine ausgedehnte 5'-3'-Resektion erfolgt mittels BLM/EXO1.

Der Annealing-Mechanismus bleibt vorwiegend unklar, wobei die Größe von mikrohomologen Fragmenten für deren Stabilität und das Reparaturergebnis verantwortlich sind. Das Annealing von ssDNA wird durch RPA verhindert. Nicht-homologe DNA-Enden werden durch einen XPF/ERCC1-Komplex entfernt. Dabei entstehen 3'-Hydroxyl-Endungen, die durch eine Polymerase θ verlängert werden. Bei einer Polymerase θ -Rekrutierung zu DSB-Endungen sind XRCC1/LIG3 sowie PARP1 beteiligt. Eine Ligation erfolgt mittels LIG3 und LIG1.

NHEJ kann bei Zellen in einer G1-Phase als ein schneller oder Artemis- und Resektions-abhängiger langsamer Weg verlaufen („resection-dependent“ NHEJ). Letzterer unterscheidet sich vom MMEJ, da er nicht von PARP1, LIG3 sondern von DNA-PKcs und Ligase IV abhängig verläuft.

Während der Verarbeitung der DSB-Endungen kann es zu Fehlpaarungen in der DNA, Verlust oder Gewinn von Nukleotiden kommen. Insbesondere „low-fidelity“ Polymerasen wie Pol θ sind für eine Hypermutagenese verantwortlich. Des Weiteren begünstigt eine langsame Reparatur-Kinetik (wie bei MMEJ) eine Entstehung von DNA-Änderungen infolge einer endogenen sowie exogenen DNA-Schädigung. Ein Artemis-Mangel führt zu einer schweren Immunschwäche. Bei BRCA2-defizienten Ovarialkarzinom-Zellen ist besonders MMEJ aktiv, sodass eine Pol θ -Inhibition als ein neues potenzielles Therapieziel eingesetzt werden könnte. Es wurde des Weiteren nachgewiesen, dass in BCR/ABL-positiven CML-Zellen der Spiegel von MMEJ-Faktoren im Gegensatz zu cNHEJ-Faktoren deutlich erhöht ist. Harnblasekarzinom-Zellen weisen einen niedrigen Spiegel der MMEJ-Faktoren auf. Es wird auch vermutet, dass Störungen bei MMEJ der mtDNA mit einer Entstehung von mitochondrialen Erkrankungen zusammenhängen, wobei LIG3 als einzige Ligase in Mitochondrien exprimiert wird (12, 50-54).

Abbildung 5 NHEJ (55)



Bei NHEJ muss es zwischen einem klassischen (canonical NHEJ) und alternativen NHEJ (z. B. MMEJ) unterschieden werden. Bei cNHEJ wird Ku, XRCC4 und DNA-Ligase IV eingesetzt. Bei alt-NHEJ stellt sich als erster Schritt das Pre-Annealing mit Rekrutierung von Resektionsfaktoren wie CtIP sowie MRN-Komplex dar. Beim Post-Annealing wird XRCC1 und DNA-Ligase III beteiligt.

1.4 Sézary Syndrom

Sézary Syndrom und Mycosis fungoides gehören zu den häufigsten Typen der kutanen T-Zell Lymphome. Mycosis fungoides wird als reifes T-Zell non-Hodgkin Lymphom mit kutaner Manifestation definiert. Lymphknoten, Blut sowie innere Organe können ebenso betroffen werden. Das Sézary Syndrom ist durch eine Erythrodermie und leukämische Beteiligung von malignen T-Zellen gekennzeichnet. Ein SéSy kann sich de novo oder aus einer MF entwickeln, des Weiteren ist bei SéSy im Vergleich zu MF eine Remissionsrate sowie Überlebenszeit geringer. Die Häufigkeit von SéSy beträgt 0,8-0,9 Fälle pro eine Million Einwohner pro Jahr. Etwas häufiger werden Männer betroffen (Männer-Frauen-Ratio 2,11) (56).

1.4.1 Pathogenese

Die Ätiologie von SéSy bleibt weiterhin unklar. Maligne T-Zellen stammen am ehesten von CD4-positiven T-Zellen oder „central memory“ T-Zellen, die typischerweise CLA („cutaneous lymphocyte antigen“), CCR4 und CCR7 exprimieren. Diese verfügen über kein hohes Proliferationspotential, sodass ein Einfluss der Mikroumgebung vermutet wird. Adhäsionsmoleküle, Chemokine und durch Langerhanszellen produzierte Zytokine spielen eine Rolle beim „Anlocken“ von malignen T-Zellen in das Hautgewebe. Des Weiteren kommt es mit einem Erkrankungsprogress zu Änderungen in der Zusammensetzung der Mikroumgebung. Bei einigen Fällen, insbesondere mit einem CD8+ Phänotyp wurde ein Zusammenhang mit einer retroviralen Infektion (HTLV1/2 oder HIV) nachgewiesen. Dies bleibt allerdings umstritten und trifft nur für einen kleinen Teil der Fälle zu (57).

Charakteristisch ist für SéSy eine endogene Immunsuppression. Diese kann durch eine erhöhte Produktion von Th2-Zytokinen, die im Endeffekt zur erniedrigten Produktion von Interleukin 2 und 12 sowie Interferon gamma führen, erklärt werden. Des Weiteren werden nicht-transformierte T-Zellen durch maligne T-Zellen unterdrückt. Eine erhöhte Expression von PD-1 („programmed cell death protein 1“) auf den malignen T-Zellen hemmt unter anderem die Funktion zytotoxischer T-Zellen. Durch eine gestörte Expression von CD40 auf den malignen T-Zellen wird eine Aktivierung und Differenzierung von dendritischen Zellen fehlgeleitet. Bei malignen T-Zellen wird eine Apoptose durch Interleukin 15 gehemmt. Dafür spricht eine verminderte Expression von CD95 sowie die erhöhte Expression von cFLIP und der Verlust des TRAIL-2 Rezeptors. In einer Genexpressionsanalyse konnte eine Überexpression von GATA3, verbundenen mit TNF α -Signalweg Genen, JUNB, JUND sowie

eine Herabregulation von Stat4 und Verlust von pro-IL 16 gefunden werden. Einige chromosomale Aberrationen (betroffen sind vor allem die Chromosomen 1, 6, 7, 8, 9, 10, 17) sind für SéSy und MF gemeinsam, andere sind für eine dieser beiden Erkrankung typisch. Dies betrifft auch die Expression bestimmter Oberflächenmarker (bei SéSy wird typischerweise CD27, CCR7, L-Selektin und CCR4, bei MF CCR4 und CLA exprimiert) (56, 58).

1.4.2 Klinische Symptomatik und Diagnostik

Zu den kutanen Symptomen von Patienten mit SéSy gehören: Erythrodermie, die nach den Diagnose-Kriterien $\geq 80\%$ der Körperoberfläche betragen sollte, lokale oder diffuse Alopezie, Keratosis pilaris-ähnliche Veränderungen, Ektropion, Keratoderma, hypertrophische Nägel, Infektionen, Erosionen und eine Lichenifikation. Als weitere SéSy-Manifestationen kann eine Lymphadenopathie, Splenomegalie, Knochenmarkinfiltration, Beteiligung von Lungen, Leber, Gastrointestinaltrakt und eine multifokale Leukoencephalopathie auftreten.

Bei SéSy-Patienten ist das Risiko von sekundären malignen Krebserkrankungen (Hodgkin-Lymphom, Non-Hodgkin Lymphome, malignes Melanoma, Urothelkarzinome) erhöht.

Bei jedem Patienten mit einer anhaltenden Erythrodermie sollte differentialdiagnostisch ein SéSy erwogen und weiter diagnostisch abgeklärt werden. In der initialen Diagnostik sollte eine Hautbiopsie mit Beurteilung des Immunphänotyps der T-Zellen und der Klonalität der T-Zell-Rezeptoren erfolgen. Bei Verdacht auf ein kutanes Lymphom sollten ein manuelles Differentialblutbild sowie eine FACS-Analyse durchgeführt werden. Zu den diagnostischen Kriterien von SéSy gehören:

1. Erythrodermie $\geq 80\%$ der Körperoberfläche
2. Klonales T-Zell-Rezeptor-Rearrangement
3. Anzahl von Sézary Zellen $\geq 1000/\mu\text{l}$ oder eines von folgenden Kriterien
 - erhöhte Anzahl von CD4+ oder CD3+ Zellen mit CD4+/CD8+ Ratio ≥ 10
 - erhöhte Anzahl von CD4+ Zellen mit einem abnormalen Phänotyp (CD4+CD7- Ratio $\geq 0,4$ oder CD4+ CD26- Ratio $\geq 0,3$) (56).

Sézary-Zellen sind durch einen typischen cerebriformen Nukleus gekennzeichnet. Für eine Stadien-Einleitung wird eine TNMB-Klassifikation der kutanen T-Zell Lymphome verwendet. Hierbei entspricht T der kutanen Manifestation, N der Beteiligung von Lymphknoten, M einer Beteiligung von inneren Organen und B dem Nachweis von

Lymphomzellen im peripheren Blut. Das Sézary Syndrom entspricht bei dieser Klassifikation T₄ (Erythrodermie) und B₂ (Sézary Zellen-Anzahl mindestens 1000/μl) (56, 58).

1.4.3 Therapie

Bei SéSy-Patienten lassen sich die Stadien IVA1 (keine Beteiligung von inneren Organen), IVA2 (Beteiligung von Lymphknoten N3, aber keine viszerale Beteiligung) oder IVB (viszerale Beteiligung ist vorhanden) unterscheiden. Die Therapiewahl hängt von klinischem Verlauf der Erkrankung ab (59). Als negative prognostische Faktoren wurden Alter über 60 Jahre, erhöhter LDH-Wert, das männliche Geschlecht, viszerale, Lymphknoten- sowie Blut-Beteiligung festgestellt (60-63). Für eine Risiko-Stratifizierung kann ein prognostischer Index CLIPi verwendet werden (64, 65). Das mediane Überleben von Patienten mit SéSy beträgt zwischen 1 und 5 Jahren (61).

Immunologische Therapien werden bei neudiagnostizierten Patienten mit langsamem Progress der Erkrankung bevorzugt eingesetzt. Die Chemotherapie wird meistens bei Patienten mit aggressivem Krankheitsverlauf verwendet. Es wurden allerdings keine Standardtherapien bei neudiagnostiziertem SéSy sowie bei Patienten mit Progress oder Rezidiv festgelegt. Diesbezüglich sollte insbesondere bei therapieresistenten Verläufen ein Einschluss in klinischen Studien erwogen werden.

Bei Patienten mit SéSy sollten regelmäßige Verlaufskontrollen zur Beurteilung des Therapieansprechens erfolgen. Dazu gehört eine Hautbeurteilung mittels z. B. „modified skin weight assessment tool“, Beurteilung der Lymphknoten mittels CT/PET-CT, sowie eine Analyse der malignen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Stadium IVA1 und IVA2

In diesen Stadien wird meistens eine extrakorporale Photophorese in Kombination mit Retinoiden, Interferon, Methotrexat, oder Histon-Deacetylase-Inhibitoren eingesetzt. Möglich ist auch eine Kombination von Retinoid (Bexaroten) mit Interferon ± Photophorese, Interferon mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren oder Methotrexat. Eine extrakorporale Photophorese (ECP) wird meistens für 2 Tage alle 2-4 Wochen durchgeführt und sollte für mindestens 6 Monate angewendet werden. Wird ein maximales Ansprechen erreicht, sollte die Therapie für mindestens 3 weitere Monate fortgeführt werden. Nach dieser Zeit kann die auf eine Erhaltungstherapie alle 6-12 Monate umgestellt werden. Eine Ansprechrate von ECP-basierten Therapien beträgt bis zu 75% (66).

Zur Therapie von Patienten mit SéSy kann sowohl niedrig-dosiertes IFN α als auch IFN γ (off-label) eingesetzt werden. Bexaroten ist für Therapie eines refraktären SéSy zugelassen und kann als eine Monotherapie oder in Kombination mit ECP oder IFN α eingesetzt werden. Ebenso wird auch Methotrexat in niedriger Dosierung 5-50 mg wöchentlich als Monotherapie oder in Kombination mit ECP oder IFN α verwendet. Histon-Deacetylase-Inhibitoren können mit IFN γ , Bexarotene oder Strahlentherapie kombiniert werden. Zu diesen gehört Vorinostat (orale Applikation) und Romidepsin (intravenöse Gabe) (56, 67).

Stadium IVB

Hierbei werden vorwiegend Histon-Deacetylase-Inhibitoren oder Chemotherapeutika verwendet. Als Monotherapie kommt pegyliertes, liposomales Doxorubicin, Gemcitabin, Fludarabin, Cladribin und Pentostatin in Frage. Zu den neuen Substanzen gehört Pralatrexat (Folsäureantagonist), Lenalidomid (immunmodulatorische Wirkung), Alemtuzumab (anti-CD52-Antikörper), Bortezomib (Proteasom-Inhibitor), Mogamulizumab (anti-CCR4-Antikörper), Pembrolizumab (anti-PD1-Antikörper) sowie Brentuximabvedotin (anti-CD30-Antikörper) (56, 68-71). Im Gegensatz zur allogenen Transplantation wird eine autologe Transplantation aufgrund von hohem Rezidiv-Risiko nicht empfohlen. Die allogene Stammzelltransplantation kann bei geeigneten Patienten zu dauerhafter Remission führen. Laut Daten von EBMT (European Society for Blood and Marrow Transplantation) betrug eine Überlebensrate nach 1 und 3 Jahren 75% und 58% (72, 73).

Adjuvante Therapie

Patienten mit SéSy leiden oft unter Pruritus, Hautreizung, Palmoplantarkeratosen, Hautschuppung sowie unter häufigen Hautinfektionen. Deshalb ist eine adjuvante Therapie ein wichtiger Teil der komplexen Behandlung. Hierbei werden topische oder systemische Steroide, Phototherapie mit UVB oder PUVA, Ganzhaut-Elektronenstrahltherapie, pflegende Externa, Antihistaminika und Antidepressiva verwendet. Eine prophylaktische Antibiose wird grundsätzlich nicht empfohlen (56).

2. Zielstellung

Ein wichtiger Schritt in der Krebsentstehung ist die fehlerhafte Korrektur von DNA-Schädigungen. Zur Reparatur von DNA-Schäden besitzen die Zellen verschiedene Reparaturmechanismen. Zu den wichtigsten gehören die Basen-Exzisions-, Nukleotid-Exzisions-, Mismatch-Reparatur, homologe Rekombination und der Non-Homologous End Joining-Mechanismus. Zu den anderen Mechanismen, deren Störungen eine maligne Transformation verursachen können, gehören unter anderem die Zellzyklus-Kontrolle sowie die epigenetische Regulation.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Proben von Patienten mit Sézary Syndrom, einer T-Zellneoplasie, untersucht. Bei dieser Erkrankung, deren Ätiologie bislang unklar ist, werden im Vergleich zu anderen Non-Hodgkin-Lymphomen viele genetische Veränderungen festgestellt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Veränderungen in Genen vor allem der DNA-Reparatur gehäuft beobachtet werden. Dafür wurden Proben von acht Patienten mit Sézary Syndrom und 2 gesunden Probanden, von denen Next-Generation-Sequencing-Daten (NGS) vorlagen, untersucht.

1. Zunächst wurden die zu untersuchenden Signalwege und die daran beteiligten Gene bestimmt.
2. Diese Gene wurden auf das Vorhandensein von Einzelnukleotid-Varianten ("single nucleotide variations/variants", SNVs) mittels Integrative Genomics Viewer durchsucht, um die SNVs bei Sézary Syndrom Patienten zu identifizieren, die nicht bei gesunden Kontrollprobanden nachweisbar waren. Diese Veränderungen können möglicherweise die Protein-Funktion und damit die Signalwege beeinflussen.
3. Es wurde Art (missens/nonsense, homozygot/heterozygot, bekannt/unbekannt) sowie Häufigkeit der gefundenen SNVs bei SéSy-Patienten analysiert, um zu prüfen, welche Veränderungen am häufigsten auftreten und ob Unterschiede zwischen den Patienten vorliegen.
4. Mittels PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) wurden mögliche Auswirkungen der nachgewiesenen SNVs auf Proteinfunktion geprüft (neutral/deletär).
5. Es wurde untersucht, ob in Genen mit Funktionen bei spezifischen DNA-Reparaturmechanismen gehäuft SNVs nachweisbar waren und damit möglicherweise DNA-Reparaturmechanismen mit besonderer pathogenetischer Bedeutung für die Entstehung von Sézary Syndrom identifiziert werden können.

3. Materialien

3.1 Verbrauchsmaterial

Erlenmeyerkolben 100 ml	VWR
Flasche steril 50 ml	VWR
Lagerungsbox 8x8	Eppendorf Research
Löffel, steril 2,5 ml	VWR
Nitrilhandschuhe	Hakle-Kimberly Deutschland GmbH
Optische adhäsive Abdeckfolie	Applied Biosystems
PCR-Tubes 0,5 ml	Eppendorf Research
Petri-Schale, steril	VWR
Pinzete	VWR
Pipetten	Eppendorf Research
Pipettenspitzen	Biozym
Reaktionsgefäß 15 ml	Sarstedt AG & Co.
Reaktionsgefäß 50 ml	Sarstedt AG & Co.
Safe Lock Tubes 2 ml	Eppendorf Research
Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf Research
Skalpell	Dahlhausen
Tube Rack 8x8	Eppendorf Research
UV-Schutzbrille	VWR
Wasserbad	Medingen

3.2 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific
Aqua destillata	Braun Melsungen AG
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Applichem
Chloroform	Roth

DEPC (Rnase-freies Wasser)	United States Biochemicals
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck AG
Ethanol	Roth
Glycerol	Roth
Glycogen	Merck AG
Isopropranolol (2-Propanol)	Merck AG
Magensiumchlorid (MgCl ₂)	Promega
Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (Na ₂ EDTA)	USB
Phosphat-buffered saline (PBS)	Merck
TRIS	United States Biochemicals
TRIzol	Ambion by Life Technologies

3.3 Molekularbiologische Produkte

DNA-Gößenstandard, 100 bp DNA-Ladder	Invitrogen
50x Advantage 2-Polymerase	Mix Clontech Laboratories
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Promega
Nucleic Acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems
peqGreen	PEQLAB
PureGene DNA Isolation Kit	Gentra
QIAquick Extraction Kit	Qiagen
Random Primer	Invitrogen
Reverse Transkriptase Super Script II	Invitrogen
RNase	Sigma-Aldrich Chemie

Bei der PCR-Methode wurden Primer von der Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH verwendet. Zur Orientierung wurde "f" für forward (vorwärts, 5'-3') und "r" für reverse (rückwärts, 3'-5') angegeben.

Tabelle 1 Primersequenzen

Gen	Primer	5'-3'-Primersequenzen
XRCC6BP1-54-f	sense	gCAgCAgCAACACgTCTCTT
XRCC6BP1-302-r	antisense	gCATCAAAACCTCCACTgACA
XRCC6BP1-534-r	antisense	gTCTCAgCgCCACCTCTAgT

3.4 Lösungen und Puffer**Tabelle 2**

Puffer/Lösungbezeichnung	Komponente	Menge
5x Gelbeladungspuffer (Agarosegelelektrophorese)	10% Bromphenolblau	50 µl
	99% Glycerol	500 µl
	1x TBE	50 µl
	Aqua destillata	500 µl
10x TBE (pH 8,3) (Agarosegelelektrophorese)	TRIS	107,81 g
	Borsäure	55,03 g
	Na ₂ - EDTA	7,4 g

3.5 Geräte

Analysewaage, 210 g	Sartorius AG
Abzug	BDK-Luft und ReinraumtechnikGmbH
Eisfördersystem, AF 10	Scotsman Industries
Gelelektrophoresekammer	VWR International
Gefrierschrank -20°C	Bosch
Heizblock, Thermoblock	GEBR Liebisch
Heizblock, Thermomixer comfort	Eppendorf Research
Kühlschrank	Bosch

Mikrowelle	Microstar
pH-Meter, pH538 Multical	WTW
Photographieeinheit, Geldoc 2000	Analytik Jena
Thermocycler, C 1000	Bio Rad
Schüttler, PMS 100	Grant Instruments
Stromversorgungsgerät, EV231	Consort
Vortexer Mixer, neolab 7-2020	Neolab
Vortexer Mixer, VF2	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik
Zentrifuge, Centrifuge 5415R	Eppendorf Research
Zentrifuge, Galaxy Mini Centrifuge	VWR
Zentrifuge, Megafuge 1. OR	Heraeus

3.6 Software und Internetbanken

Ensamble Genome Browser	https://www.ensembl.org
Gene Datenbank	http://www.genecards.org
Nucleotide Blast Search	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov
PROVEAN	http://provean.jcvi.org
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Quaintity-One Version 4.1	BioRad
The Integrative Genomics Viewer	https://software.broadinstitute.org/software/igv

3.7 Statistisk

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Programm R-3.5. Zum Vergleich der Patienten und der untersuchten Mechanismen wurde aufgrund der kleinen Gruppen-Anzahl der Fisher-Test verwendet. Eine statistische Signifikanz bestand ab einem p-Wert $<0,05$. Beim Vergleich von 2 Patienten wurde der p-Wert mittels FDR (False Discovery Rate) korrigiert.

4. Methoden

4.1 Sequenzierung der DNA von Patienten mit Sézary Syndrom

Im Rahmen der Kooperation mit Prof. Rein Willemze aus der Klinik für Dermatologie der Universität Leiden in Holland erhielt unsere Klinik genomische DNA von 8 an Sézary Syndrom erkrankten Patienten. Die DNA wurde aus dem mit CD4+ T-Zellen eingereicherten peripheren Blut bei Erstdiagnose isoliert. Die Proben wurden zur Genom-Sequenzierung an BGI-Hong-Kong verschickt. Für die Sequenzierung wurde HiSeq2000 Illumina verwendet.

Die dadurch entstandene Daten wurden mittels The Integrative Genomics Viewer dargestellt. Daraufhin erfolgte eine mindestens zweimalige Durchsicht der ausgewählten Gene auf SNVs. Die nicht in der Kontrollproben aufgetreten SNVs wurden identifiziert. In der NCBI Gen Bank konnte ein Status (bekannt oder unbekannt) der gefundenen SNVs verifiziert werden. Mittels PROVEAN (*Protein Effect Variation Analyzer*) wurde SNV-Auswirkung auf die Proteinfunktion geprüft (neutral/deletär).

4.2 Gewinnung der DNA von Kontrollprobanden

4.2.1 Isolation von Lymphozyten

Als Kontrollproben wurde das Blut von gesunden Spendern aus der Abteilung für Transfusionsmedizin Universitätsmedizin Greifswald verwendet. Die mononukleären Zellen wurden mittels Ficoll-Paque gewonnen. Bei dieser Methode wird eine Dichte-Differenz zwischen einer Ficoll-Lösung und verschiedenen Blutzellen verwendet. Die optimale Temperatur liegt dafür bei 18-20°C. Zunächst wurde 2 ml Blut mit Antikoagulant mit 2 ml PBS verdünnt. Daraufhin wurde das verdünnte Blut in ein Tube mit 3 ml Ficoll-Lösung aufgeschichtet und für 20 Minuten bei 400x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befand sich eine Schicht mit mononukleären Zellen zwischen Ficoll-Lösung und Plasma. Diese Schicht wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Tube, das bis 10 ml mit PBS befüllt wurde, übertragen. Nach Vermischen erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 400x g. Im Anschluß wurde der Überstand verworfen. Das Tube wurde erneut bis 10 ml mit PBS befüllt und es erfolgte eine nochmalige Zentrifugation mit Verwerfen des Überstandes.

4.2.2 Gewinnung der genomischen DNA (gDNA)

Die gDNA konnte aus den isolierten Lymphozyten mit Hilfe des Extraktions-Kits der Firma Gentra gewonnen werden. Das T-Zellen enthaltene Pellet wurde in ein 15 ml Tube umgefüllt und mit 10 ml PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 300x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Zellpellet 3 ml Lyse-Lösung hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 15 µl RNase hinzugefügt und die Lösung für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Daraufhin wurde 3 ml Isopropanol zur Fällung der DNA zugegeben. Im weiteren Schritt erfolgte eine Zentrifugation bei 1000x g für 5 Minuten. Nach dem Verwerfen des Überstandes und Hinzugabe von 5 ml 70% Ethanol erfolgte eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet für 15 Min. bei Raumtemperatur getrocknet. Daraufhin wurden 200 µl Aqua destillata zugegeben und das Tube für 60 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert bis das Pellet vollständig gelöst war. Die DNA-Lösung konnte dann bei 4°C gelagert werden.

4.2.3 Gewinnung der komplementären DNA (cDNA)

Die RNA wurde mit der TRIzol Methode (Firma Ambion by Life Technologies) gewonnen. TRIzol ist eine Lösung von Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, die zur RNA-Isolation verwendet wird. Die cDNA entsteht aus der RNA mittels einer reversen Transkriptase. Als Primer werden random Hexamer-Oligonukleotide verwendet. Durch eine RNase wird die mRNA von cDNA abgebaut. Im weiteren Schritt entsteht mittels einer Polymerase ein komplementärer DNA-Strang.

Gewinnung von RNA

Zunächst wurde eine Zellsuspension (10^5 – 10^6 Zellen) bei 500x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und 800 µl von TRIzol-Reagenz zu verbliebenem Zellpellet gegeben und resuspendiert. Dadurch konnten die Zellen lysieren. Diese Lösung kann bei -20°C gelagert werden. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 200 µl Chloroform hinzugegeben. Daraufhin erfolgte ein kräftiges Schütteln für 15 Sekunden und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten. Im Anschluß wurde die Probe für 10 Minuten bei 12 000x g und 4°C zentrifugiert. Dadurch entstand eine untere organische Phase mit Phenol und Chloroform, eine Protein-haltige Interphase sowie eine farblose, wässrige obere Schicht mit RNA-Lösung. Die RNA-

enthaltene Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Tube überführt. Daraufhin erfolgte eine Zugabe von 500 µl Isopropanol zum Ausfällen der RNA, 1µl Glykogen zur Verbesserung der entstandenen Pellet-Sichtbarkeit und eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Probe wurde erneut für 10 Minuten bei 12000x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und 1 ml 75% Ethanol hinzugegeben. Das Tube wurde geschüttelt und für 5 Minuten bei 7500x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 Minuten an der Luft zum Trocknen gelassen. Im letzten Schritt erfolgte eine Hinzugabe von 15 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser und die Probe mit gelöster RNA wurde bei -80°C eingefroren.

Die Qualität der isolierten RNA wurde mittels einer Gelelektrophorese (2 µl RNA mit 2 µl Beladungspuffer und 8 µl Aqua destillata) geprüft. Eine gute Qualität wird durch zwei gut abgrenzbaren, klaren Banden festgestellt.

Synthese der cDNA mittels einer reversen Transkription der RNA

Eine Mischung von 5,5 µl RNA mit 0,5 µl Random Primer und 0,5 µl dNTPs wurde in einem Cycler für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und zunächst auf 4°C langsam abgekühlt. Durch das Erhitzen werden RNA-Sekundärstrukturen aufgeschmolzen. Beim Abkühlen hybridisieren die Primer an die RNA. Anschließend wurden 2µl First Strand Buffer, 1 µl DTT sowie 0,5 µl SuperScript II Reverse Transkriptase hinzugefügt und es erfolgte eine reverse Transkription nach folgendem Programm:

25°C 15 Min.	42°C 50 Min.	70°C 15 Min.	4°C ∞
--------------	--------------	--------------	-------

Eine optimale Temperatur für Wirkung einer Reversen Transkriptase, sodass sich komplementäre Nukleotide an RNA-Strang anknüpfen können, beträgt 42°C. Die gewonnene cDNA wurde 1:10 mit Aqua destillata verdünnt und bei -20°C gelagert.

4.2.4 Amplifizierung der DNA von Kontrollprobanden

Die Amplifizierung der genomischen sowie komplementären DNA erfolgte mittels der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Der PCR-Prozess bestand aus 40 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt wurden. Jeder Zyklus bestand aus 3 Schritten. Im ersten Schritt (Denaturierung) wurde die DNA auf 95°C für 30 Sekunden erhitzt, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen. Daraufhin erfolgte im zweiten Schritt eine

Primerhybridisierung (primer annealing). Dafür wurde die Temperatur auf 58°C für 30 Sekunden gesenkt. Die ideale Temperatur liegt 5 bis 10°C unter dem Schmelzpunkt der Primer und ist von dem Guanin und Cytosin-Gehalt abhängig. Diese ermöglicht eine Anlagerung der Primer an die DNA. Im dritten Schritt erfolgte eine Amplifikation (Elongation), die mit einer Temperatur von 72°C für 1 Minute durchgeführt wurde. Diese Temperatur ist vom Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase abhängig und wurde im Anschluß an die 40 Amplifikationszyklen für weitere 10 Minuten gehalten. Dieser letzte Elongationsschritt dient dazu um unvollständig synthetisierte DNA-Stränge zu komplettieren. Nach Beendigung aller Zyklen wurden die Reaktionsansätze auf 4°C gekühlt. Das allgemeine PCR-Protokoll wurde in der Tabelle 3 und 4 zusammengefasst.

Tabelle 3 PCR-Protokoll

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Min.:Sek.)	Zyklen
Denaturierung	95	5:0	x 1
Denaturierung	95	0:30	x 40
Amplifikation	58	0:30	
Elongation	72	1:0	
Elongation	72	5:0	x1
Ende	4	∞	

Tabelle 4 PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen für eine Probe (µl)
Aqua destillata	16,85
10x PCR Buffer	2,5
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	1,5
Dimethylsulfoxid (DMSO)	1,25
Primer XRCC6BP1-54-f 10 µM	0,7
Primer XRCC6BP1-302-r 10 µM	0,7
Advantage Polymerase	0,5
Σ	24
c/gDNA	+1

4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung des PCR-Produktes wurde eine Gelelektrophorese verwendet. Bei dieser Methode werden Nukleinsäurefragmente nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei eine Konzentration der Agarose im Gel je nach Größe der DNA-Fragmente gewählt werden sollte. Zur Herstellung der Agarosegele wurde eine 1% Agaroselösung vorbereitet. Nach dem Mischen wurde diese in einer Mikrowelle so lange erhitzt, bis eine vollkommen klare Lösung vorliegt. Das Erhitzen musste gelegentlich pausiert werden, um die Lösung zu schwenken. Dabei war es wichtig, auf den Siedeverzug zu achten. Nach dem Abkühlen der Agaroselösung auf etwa 50°C wurden 6 µl peqGreen pro 100 ml Gelsuspension zugegeben und die Mischung geschwenkt. Die Agaroselösung wurde in die Kammer gegossen und die Kämme an die richtigen Positionen eingebracht. Nach ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur war die Polymerisation der Gele abgeschlossen, sodass das Gel in eine Elektrophoresekammer gebracht werden konnte. Diese wurde mit 0,5x TBE-Laufpuffer gefüllt, sodass das Gel vollständig bedeckt wurde. Nach dem Pipettieren von jeweils 10µl vom PCR-Produkt, 2µl Gelbeladungspuffer und 1µl von Marker, Anlage eines elektrischen Feldes mit Spannung von 100V und 15W wurde eine Elektrophorese für ca 40 Minuten durchgeführt. Die peqGreen-Moleküle interkalieren in die DNA-Basen. Dadurch wird die Fluoreszenz der DNA unter UV-Licht erhöht. Infolgedessen leuchten die Stellen mit DNA im Agarosegel, wobei die Lichtintensität von der Nukleinsäure-Konzentration sowie ihrer Länge proportional abhängt. Mit Hilfe der Photographieeinheit Gel Doc 200-UV-Kammer und der Anlytik Jena AG UV Solo Imager erfolgte die weitere Auswertung.

4.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegel

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit. Die DNA-Banden, die die DNA-Fragmente von Interesse enthielten, wurden auf einem UV-Tisch aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten. In das Reaktionsgefäß mit Gelstücken wurde 3x Gelvolumen des QG Puffers zugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation von ca. 10 Minuten bei 50°C in einem Heizblock. Daraufhin wurden die Gelstücke mittels eines Vortexers gelöst. Aufgrund von im QG-Puffer enthaltenen pH-Indikatoren konnte der pH-Wert, der sich als eine Farbe der Mischung zeigte, überprüft werden. Bei einem Farbumschlag in die Farbe orange oder violet erfolgte die Zugabe von 10 µl von 3M Natriumacetat. Daraufhin wurde Isopropanol (1/3x Gelvolumen) hinzugefügt und vermischt. Die Mischung wurde auf QIAquick Reaktionsgefäße mit Säulen pipettiert und für 1 Minute bei 17 900x g zentrifugiert. Dadurch konnte die DNA an die Säule des

Reaktionsgefäßes gebunden werden. Der Durchfluß wurde anschließend verworfen. Auf den Überstand erfolgte die Zugabe von 500 µl QG Puffer und eine nochmalige Zentrifugation für eine Minute um die verbliebenen Gelreste zu entfernen. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, erfolgte Waschen der Säule mit PE Puffer für 1 Minute. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und der Durchfluss ebenfalls verworfen. Im Anschluß erfolgte der letzte Zentrifugationsschritt, um letzte Flüssigkeitsreste zu entfernen. Die Elution erfolgte in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß unter Zugabe von 40 µl Aqua destillata. Nach 1 Minute Inkubation wurde für 1 Minute bei 13 900x g zentrifugiert. Die Proben wurden zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.5 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Proben wurden zur Sequenzierung an LGC Genomics GmbH, Berlin verschickt. Für die Sequenzierung wurde die Sanger Methode verwendet. Bei dieser Methode entstehen im ersten Schritt (Denaturierung) durch die Erwärmung 2 DNA-Einzelstränge. Daraufhin erfolgt ein Annealing eines Primers. Im dritten Schritt erfolgt eine Elongation von DNA mittels Polymerase. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass man außer den 4 Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) auch Didesoxyribonukleosidtriphosphat (ddNTP) verwendet. Die ddNTPs sind mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Des Weiteren besitzen sie keine 3'-Hydroxygruppe, sodass die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids nicht stattfinden kann. Somit ist nachdem Einbau eines ddNTPs durch die Polymerase eine weitere Verlängerung des neu synthetisierten DNA-Strangs nicht möglich. Durch die Strangabbrüche nach Einbau eines fluoreszenz-markierten ddNTP entstehen DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Länge und unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung, je nach verwendetem ddNTP. Bei der anschließenden Kapillarelektrophorese kann durch Auswertung von Fragmentlänge und Fluoreszenzsignal die DNA-Sequenz festgestellt werden. LGC Genomics benutzt ABI 3730XL und 3130XL für Sanger Sequenzierung. Die Ergebnisse wurden online übermittelt. Die Auswertung erfolgte mittels Chromas Lite Version 2.01 und durch den weiteren Vergleich der Probensequenz mit der Originalsequenz mittels „Nucleotide Blast Search“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

5. Ergebnisse

5.1 Liste von ausgewählten Genen

Eine Liste von ausgewählten Genen, die vor allem an DNA-Reparatur Mechanismen und Zell-Zyklus Kontrolle beteiligte Proteine kodieren und auf SNVs durchsucht wurden, ist in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5

Nr.	Gen	Position	Nr.	Gen	Position
1.	ABL1 <i>Abelson Tyrosine-Protein Kinase</i>	9q34.12	2.	AKT1 <i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	14q32.33
3.	ANKRD17 <i>Ankyrin Repeat Domain 17</i>	4q13.3	4.	APEX1 <i>Apurinic/apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1</i>	14q11.2
5.	APLF <i>Aprataxin And PNKP Like Factor</i>	2p13.3	6.	APTX <i>Aprataxin</i>	9p21.1
7.	ATM <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	11q22.3	8.	ATRX <i>Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked</i>	Xq21.1
9.	BCL2 <i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>	18q21.33	10.	BLM <i>Bloom Syndrome RecQ Like Helicase</i>	15q26.1
11.	BRCA1 <i>Breast Cancer 1, early-onset</i>	17q21.31	12.	BRCA2 <i>Breast Cancer 2, early-onset</i>	13q13.1
13.	BTG2 <i>B-Cell Translocation Gene 2</i>	1q32.1	14.	CCND1 <i>Cyclin D1</i>	11q13.3
15.	CCNH <i>Cyclin H</i>	5q14.3	16.	CDK7 <i>Cyclin Dependent Kinase 7</i>	5q13.2
17.	CEP57 <i>Centrosomal Protein 57</i>	11q21	18.	CETN2 <i>Centrin 2</i>	Xq28
19.	CHEK1 <i>Checkpoint Kinase 1</i>	11q24.2	20.	CHEK2 <i>Checkpoint Kinase 2</i>	22q12.1
21.	CSA (ERCC8) <i>Excision Repair Cross-Complementation Group 8</i>	5q12.1	22.	CSB (ERCC6) <i>Excision Repair Cross-Complementation Group 6</i>	10q11.23
23.	CUL4A <i>Cullin 4A</i>	13q34	24.	CUL4B <i>Cullin 4B</i>	Xq24
25.	DDB1 <i>Damage Specific DNA Binding Protein 1</i>	11q12.2	26.	DMC1 <i>DNA Meiotic Recombinase 1</i>	22q13.1
27.	DNMT1 <i>DNA Methyltransferase 1</i>	19p13.2	28.	DNMT3A <i>DNA Methyltransferase 3 Alpha</i>	2p23.3
29.	DNMT3B <i>DNA Methyltransferase 3 Beta</i>	20q11.21	30.	DNMT3L <i>DNA Methyltransferase 3 Like</i>	21q22.3
31.	DUSP7 <i>Dual Specificity Phosphatase 7</i>	3p21.2	32.	E2F1 <i>E2F Transcription Factor 1</i>	20q11.22
33.	ERCC1 <i>Excision Repair Cross-Complementation Group 1</i>	19q13.32	34.	ERCC2 <i>Excision Repair Cross-Complementation Group 1</i>	19q13.32

Nr.	Gen	Position	Nr.	Gen	Position
35.	EXO1 <i>Exonuclease 1</i>	1q43	36.	FANCG <i>Fanconi Anemia Complementation Group G</i>	9p13.3
37.	FBH1 (FBXO18) <i>F-Box DNA Helicase 1</i>	10p15.1	38.	FEN1 <i>Flap Structure-Specific Endonuclease 1</i>	11q12.2
39.	GEN1 <i>GEN1, Holliday Junction 5' Flap Endonuclease</i>	2p24.2	40.	GTF2H1 <i>General Transcription Factor IIH Subunit 1</i>	11p15.1
41.	GTF2H2 <i>General Transcription Factor IIH Subunit 2</i>	5q13.2	42.	IGHMBP2 <i>Immunoglobulin Mu Binding Protein 2</i>	11q13.3
43.	LIG1 <i>DNA Ligase 1</i>	19q13.33	44.	LIG3 <i>DNA Ligase 3</i>	17q12
45.	LIG4 <i>DNA Ligase 4</i>	13q33.3	46.	MAPK1 <i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>	22q11.22
47.	MAPK3 <i>Mitogen-Activated Protein Kinase 3</i>	16p11.2	48.	MAPK8 <i>Mitogen-Activated Protein Kinase 8</i>	10q11.22
49.	MAPK14 <i>Mitogen-Activated Protein Kinase14</i>	6p21.31	50.	MBD4 <i>Methyl-CpG Binding Domain 4</i>	3q21
51.	MDM2 <i>Double Minute 2, Human Homolog Of; P53-Binding Protein</i>	12q15	52.	MLH1 <i>MutL Homolog 1</i>	3p22.2
53.	MLH3 <i>MutL Homolog 3</i>	14q24.3	54.	MNAT1 <i>Menage A Trois 1; CAK Assembly Factor</i>	14q23.1
55.	MPG <i>N-Methylpurine DNA Glycosylase</i>	16p13.3	56.	MRE11 <i>Meiotic Recombination 11 Homolog A</i>	11q21
57.	MSH2 <i>MutS Homolog 2</i>	2p21	58.	MSH3 <i>MutS Homolog 3</i>	5q14.1
59.	MSH6 <i>MutS Homolog 6</i>	2p16.3	60.	MTOR <i>Mechanistic Target Of Rapamycin</i>	1p36.22
61.	MUTYH <i>MutY DNA Glycosylase</i>	1p34.1	62.	N4BP2 <i>NEDD4 Binding Protein 2</i>	4p14
63.	NAT10 <i>N-Acetyltransferase 10</i>	11p13	64.	NBN <i>Nibrin</i>	8q21.3
65.	NEIL1 <i>Nei Like DNA Glycosylase 1</i>	15q24.2	66.	NEIL2 <i>Nei Like DNA Glycosylase 2</i>	8p23.1
67.	NHEJ1 <i>Non-Homologous End Joining Factor 1</i>	2q35	68.	NTHL1 <i>Nth Like DNA Glycosylase 1</i>	16p13.3
69.	OGG1 <i>8-Oxoguanine DNA Glycosylase</i>	3p25.3	70.	PALB2 (FANCN) <i>Partner And Localizer Of BRCA2</i>	16p12.2
71.	PARP1 <i>Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1</i>	1q42.12	72.	PCNA <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>	20p12.3

Nr.	Gen	Position	Nr.	Gen	Position
73.	PMS1 <i>PMS1 Homolog 1, Mismatch Repair System Component</i>	2q32.2	74.	PMS2 <i>PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component</i>	7p22.1
75.	PMS2P3 <i>Postmeiotic Segregation Increased 2 Pseudogene 3</i>	7q11.23	76.	PNKP <i>Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase</i>	19q13.33
77.	POLA1 <i>DNA Polymerase Alpha 1, Catalytic Subunit</i>	Xp22.11	78.	POLD1 <i>DNA Polymerase Delta 1, Catalytic Subunit</i>	19q13.33
79.	POLD2 <i>DNA Polymerase Delta 2, Accessory Subunit</i>	7p13	80.	POLD3 <i>DNA Polymerase Delta 3, Accessory Subunit</i>	11q13.4
81.	POLD4 <i>DNA Polymerase Delta 4, Accessory Subunit</i>	11q13.2	82.	POLE <i>DNA Polymerase Epsilon, Catalytic Subunit</i>	12q24.33
83.	POLK <i>DNA Polymerase Kappa</i>	5q13.3	84.	POLQ <i>DNA Polymerase Theta</i>	3q13.33
85.	PRKDC <i>Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Polypeptide</i>	8q11.21	86.	RAD1 <i>RAD1 Checkpoint DNA Exonuclease</i>	5p13.2
87.	RAD18 <i>RAD18, E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>	3p25.3	88.	RAD21 <i>RAD21 Cohesin Complex Component</i>	8q24.11
89.	RAD23B <i>RAD23 Homolog B, Nucleotide Excision Repair Protein</i>	9q31.2	90.	RAD50 <i>RAD50 Double Strand Break Repair Protein</i>	5q31.1
91.	RAD51 <i>RAD51 Recombinase</i>	15q15.1	93.	RAD51B <i>RAD51 Paralog B</i>	14q24.1
93.	RAD52 <i>RAD52 Homolog, DNA Repair Protein</i>	12p13.33	94.	RAD54B <i>DNA Repair And Recombination Protein RAD54B</i>	8q22.1
95.	RAD54L <i>RAD54 Like</i>	1p34.1	96.	RB1 <i>RB Transcriptional Corepressor 1</i>	13q14.2
97.	RBBP8 <i>RB Binding Protein 8, Endonuclease</i>	18q11.2	98.	RECQL5 <i>RecQ Like Helicase 5</i>	17q25.1
99.	REV1 <i>REV1, DNA Directed Polymerase</i>	2q11.2	100.	RFC1 <i>Replication Factor C Subunit 1</i>	4p14
101.	RPA1 <i>Replication Protein A1</i>	17p13.3	102.	RTEL1 <i>Regulator Of Telomere Elongation Helicase 1</i>	20q13.33
103.	SEMA4A <i>Semaphorin 4A</i>	1q22	104.	SLX2A (EME1) <i>SLX2 Structure-Specific Endonuclease Subunit Homolog A</i>	17q21.33
105.	SLX3 (MUS81) <i>MUS81 Structure-Specific Endonuclease Subunit</i>	11q13.1	106.	SLX4 (FANCP) <i>SLX4 Structure-Specific Endonuclease Subunit</i>	16p13.3
107.	SMG1 <i>SMG1 Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinase</i>	16p12.3	108.	SNMC1 (DCLRE1C) <i>Protein Artemis</i>	10p13

Nr.	Gen	Position	Nr.	Gen	Position
109.	SUMO1 <i>Small Ubiquitin-Like Modifier 1</i>	2q33.1	110.	TDP1 <i>Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1</i>	14q32.11
111.	TOP3A <i>DNA Topoisomerase III Alpha</i>	17p11.2	112.	TP53 <i>Tumor Protein P53</i>	17p13.1
113.	TP73 <i>Tumor Protein P73</i>	1p36.32	114.	TRRAP <i>Transformation/Transcription Domain Associated Protein</i>	7q22.1
115.	TREX1 <i>Three Prime Repair Exonuclease 1</i>	3p21.31	116.	UNG <i>Uracil DNA Glycosylase</i>	12q24.11
117.	WRN <i>Werner Syndrome RecQ Like Helicase</i>	8p12	118.	XPA <i>Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group A</i>	9q22.33
119.	XPB (ERCC3) <i>Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group B</i>	2q14.3	120.	XPC <i>Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C</i>	3p25.1
121.	XPE (DDB2) <i>Damage Specific DNA Binding Protein 2</i>	11p11.2	122.	XPF (ERCC4) <i>Xeroderma Pigmentosum Group F-Complementing Protein</i>	16p13.12
123.	XPG (ERCC5) <i>Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group G</i>	13q33.1	124.	XRCC1 <i>X-Ray Repair Cross Complementing 1</i>	19q13.31
125.	XRCC2 <i>X-Ray Repair Cross Complementing 2</i>	7q36.1	126.	XRCC3 <i>X-Ray Repair Cross Complementing 3</i>	14q32.33
127.	XRCC4 <i>X-Ray Repair Cross Complementing 4</i>	5q14.2	128.	XRCC5 <i>X-Ray Repair Cross Complementing 5</i>	2q35
129.	XRCC6 <i>X-Ray Repair Cross Complementing 6</i>	22q13.2	130.	XRCC6BP1 <i>X-Ray Repair Cross Complementing 6-Binding Protein 1</i>	12q14.1

Diese Gene wurden in Abhängigkeit von dem DNA-Reperaturmechanismus bzw. anderen Funktionen, an denen sie beteiligt sind, weiter aufgelistet.

Zellzyklus/Apoptose: ABL1, ANKRD17, BCL2, BTG2, CCND1, CCNH, CDK7, CEP57, CHEK1, CHEK2, DUSP7, E2F1, FANCG, MAPK1, MAPK3, MAPK8, MAPK14, MDM2, MTOR, RAD1, RAD21, RB1, TP53, TP73

BER: APEX1, APTX, CETN2, FEN1, LIG1, MPG, MUTYH, NEIL1, NEIL2, NTHL1, OGG1, PARP1, PCNA, PNKP, REV1, RFC1, TDP1, TREX1, UNG, XRCC1

NER: CSA, CSB, CUL4A, ERCC1, ERCC2, GTF2H1, GTF2H2, LIG3, MNAT1, PCNA, POLE, POLK, POLQ, RAD1, RAD18, RAD21, RAD23B, RPA1, XPA, XPB, XPC, XPE, XPF, XPG

MMR: EXO1, MBD4, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, N4BP2, PCNA, PMS1, PMS2, PMS2P3, POLD1, POLD2, POLE, RAD51, RFC1, RPA1, TP53

HR: ABL1, AKT1, ATM, BCL2, BLM, BRCA1, BRCA2, CHEK1, DMC1, EXO1, FANCG, FBH1, GEN1, MDM2, MRE11, NBN, PALB2, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD52, RAD54B, RAD54L, RBBP8, RECCQL5, RTL1, SLX2A, SLX3, SLX4, TOP3A, TP53, TRRAP, WRN, XRCC2, XRCC3

NHEJ: ABL1, APEX1, APLF, APTX, ATM, CIB1, EXO1, LIG4, MDM2, MRE11, NBN, NHEJ1, PNKP, PRKDC, RPA1, SNMC1, TDP1, TP53, WRN, XRCC1, XRCC4, XRCC5, XRCC6, XRCC6BP1

MMEJ: BLM, ERCC1, EXO1, LIG3, MRE11, NBN, PARP1, POLD1, POLD2, POLD3, POLD4, RAD50, RPA1, TREX1, XPF

Epigenetische Regulation: ATRX, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, NAT10, TRRAP

Andere: IGMBP2 (Transkription), POLA1 (Replikation), SEMA4A (T-Zell Aktivierung), SMG1 (Nonsens-vermittelter DNA-Abbau), SUMO1 (Einfluss auf Gene der DNA-Reparatur, Transkription, Apoptose, Transport in den Nukleus)

5.2 Durchsuchen von Genen auf SNVs mittels Integrative Genomics Viewer

Beim Durchsuchen von ausgewählten Genen auf SNVs wurden nur folgende Veränderungen in Betracht gezogen:

1. Veränderungen, die nicht bei Kontrollproben auftreten,
2. Veränderungen, die sich im Bereich der kodierenden Sequenz eines Gens befinden,
3. Veränderungen, bei denen min. 3 Genotypisierungen (Reads) des ausgewählten Gens vorliegen,

4. Veränderungen, die einen Einbau einer anderen Aminosäure in das Protein verursachen (missense),
5. Veränderungen, die zu einem Stopcodon führen (nonsense).

Wichtig dabei war es, den Status der aufgetretenen Varianten (bekannt oder unbekannt) laut NCBI zu prüfen. Um festzustellen, ob eine homozygote oder heterozygote Variation vorliegt, wurde ein Verhältnis von SNV-Anzahl zu einer Anzahl von allen vorliegenden Genotypisierungen berechnet. Es wurde angenommen, dass eine homozygote Variation bei einem Wert $>0,8$ vorliegt. Bei einem Wert $<0,8$ wurde von einer heterozygoten Variation ausgegangen (Untergrenze 0,1). Die durch DNA-Triplets kodierte Aminosäuren wurden nach dem genetischen Code nach Maetthei und Nierenberg (Abbildung 6) festgestellt. Die Abkürzungen der Aminosäuren wurden nach International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) verwendet. Mittels PROVEAN (www.provean.jcvi.org) wurde bei unbekanntem SNVs geprüft, ob eine Missense-Veränderung eine Proteinfunktion beeinflusst (Bezeichnung in der Tabelle 6: neutral, deletär oder unklar bei nicht gefundenen SNVs). Die gefundenen SNVs wurden in den Abbildungen 7, 8 und Tabelle 6 dargestellt.

Abbildung 6 Genetischer Code (74)

Aus den DNA-Triplets kann die kodierte Aminosäure nach dem genetischen Code festgestellt werden.

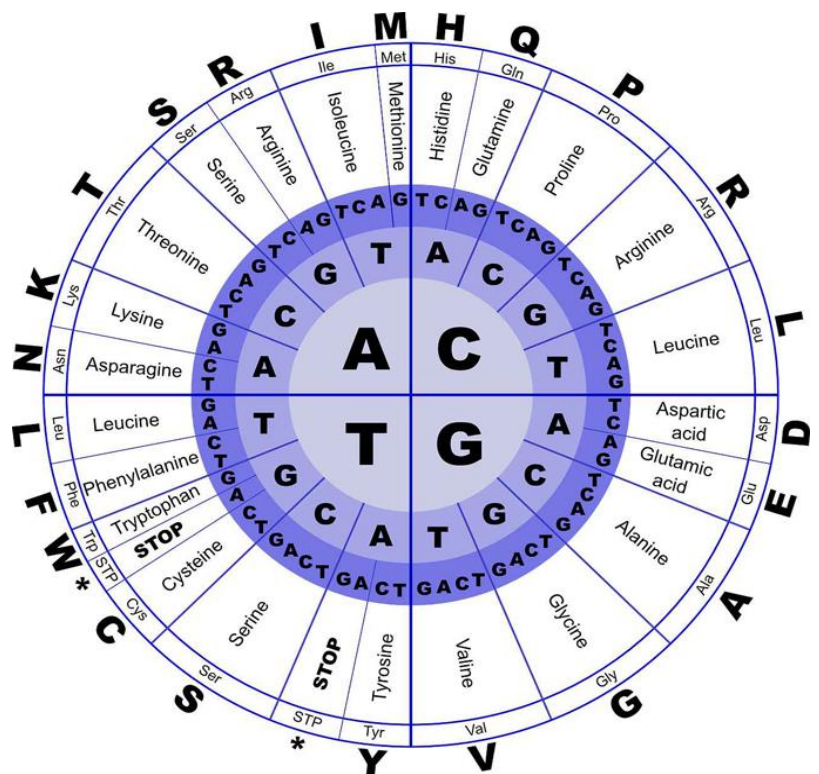
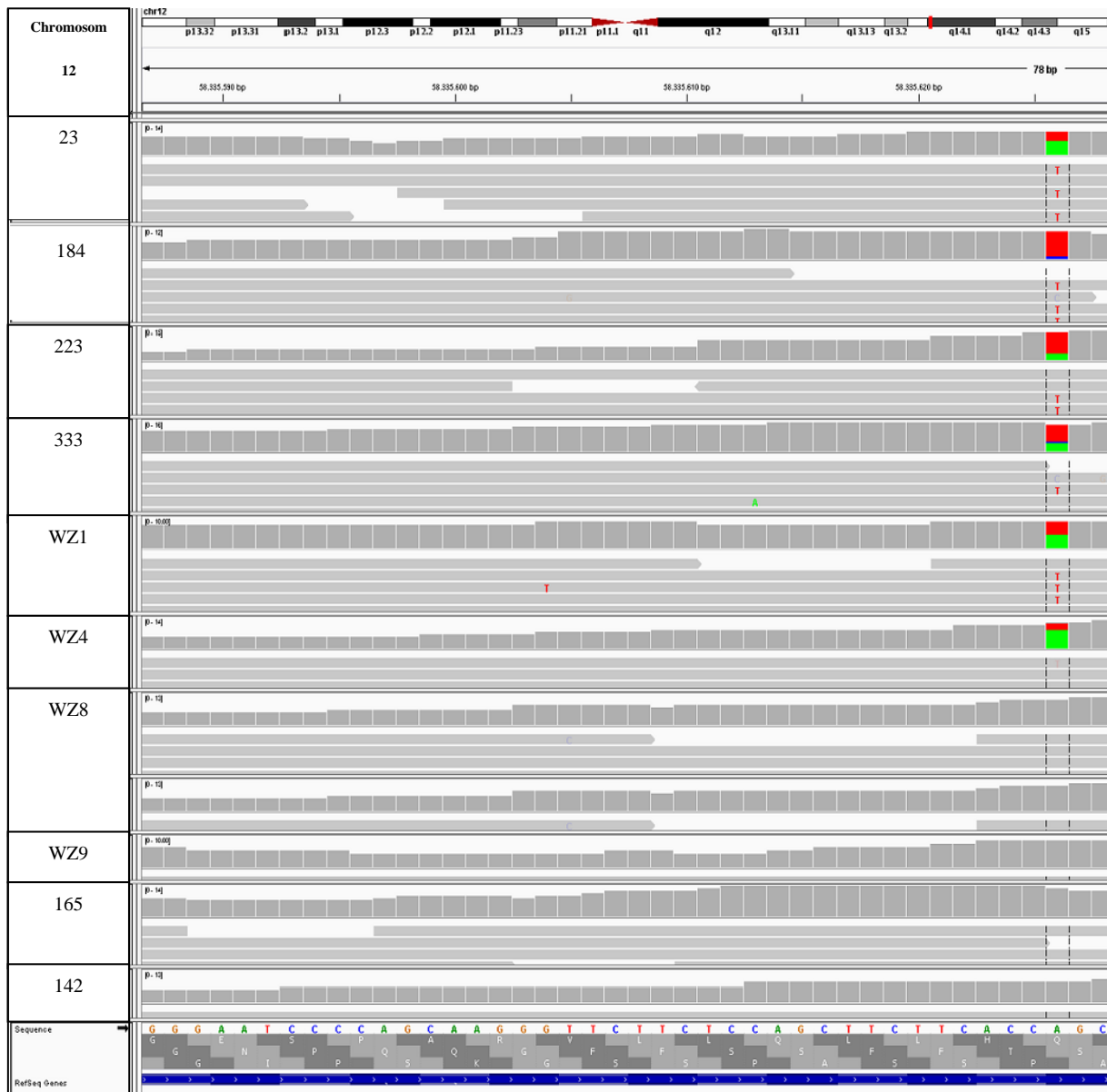


Abbildung 7 Darstellung des XRCC6BP1 Gens mittels Integrative Genomics Viewer



Vertikal: Patienten (23, 184, 223, 333, WZ1, WZ4, WZ8, WZ9) und Kontrollproben (165, 142). Horizontal: DNA-Triplets in Richtung nach rechts. Identifizierter SNV mit einem Codon-Tausch AGC → TGC und konsekutiver Aminosäure-Änderung S → C in der Position 48.

Tabelle 6

Nr.	Gen	Probe	Exon	mRNA- Nummer	Position der Aminosäure	SNV	Aminosäure-Tausch	Anzahl von SNVs/Reads	Ratio SNVs/Reads	Art der Variation	SNV- Status	Auswirkung auf Proteinfunktion
1.	AKT1	WZ9	7	NM_005163	208	CCC→CAC	P→H	1/4	0,25	hetero	unbekannt	deletär
		WZ1	12	NM_005163	419	AAG→AAT	K→N	1/4	0,25	hetero	unbekannt	deletär
2.	APLF	WZ4	7	NM_173545	336	CTT→TTT	L→F	11/22	0,5	hetero	bekannt	
		WZ8						6/9	0,67	hetero		
3.	ATRX	WZ1 23	9	NM_000489	929	CAG→GAG	Q→E	15/23 16/16	0,65 1	hetero homo	bekannt	
4.	BLM (RECQL2)	WZ1	13	NM_000057	868	CCG→CTG	P→L	14/21	0,67	hetero	bekannt	
		WZ4						11/25	0,44	hetero		
		WZ1 WZ4	21	NM_000057	1321	GTA→ATA	V→I	8/15 13/25	0,53 0,52	hetero hetero	bekannt	
5.	BRCA1	WZ8	10	NM_007294	693	GAC→AAC	D→N	16/24	0,67	hetero	bekannt	
		WZ1	10	NM_007294	871	CCG→CTG	P→L	2/8	0,25	hetero	bekannt	
		WZ4						6/14	0,42	hetero		
		WZ8						13/25	0,52	hetero		
		WZ9						16/26	0,61	hetero		
		23						16/17	0,94	homo		
184	8/16	0,5	hetero									

Nr.	Gen	Probe	Exon	mRNA- Nummer	Position der Aminosäure	SNV	Aminosäure-Tausch	Anzahl von SNVs/ Reads	Ratio SNVs/Reads	Art der Variation	SNV- Status	Auswirkung auf Proteinfunktion
5.	BRCA1	WZ1	10	NM_007294	1038	GAA→GGA	E→G	6/14	0,43	hetero	bekannt	
		WZ4						8/17	0,47	hetero		
		WZ8						23/38	0,60	hetero		
		WZ9						27/40	0,68	hetero		
		23						24/25	0,96	homo		
		184						8/17	0,47	hetero		
		WZ1	10	NM_007294	1183	AAA→AGA	K→R	8/20	0,4	hetero	bekannt	
		WZ4						12/25	0,48	hetero		
		WZ8						26/33	0,79	hetero		
		WZ9						18/30	0,6	hetero		
		23						30/30	1	homo		
		184						10/17	0,58	hetero		
		WZ1	15	NM_007294	1613	AGT→GGT	S→G	8/23	0,35	hetero	bekannt	
		WZ4						14/22	0,64	hetero		
		WZ8						10/23	0,43	hetero		
		WZ9						11/24	0,46	hetero		
23	15/16	0,94						homo				
184	5/11	0,45						hetero				
WZ9	15	NM_007294	1652	ATG→ATA	M→I	20/26	0,77	hetero	bekannt			

Nr.	Gen	Probe	Exon	mRNA- Nummer	Position der Aminosäure	SNV	Aminosäure-Tausch	Anzahl von SNVs/ Reads	Ratio SNVs/Reads	Art der Variation	SNV- Status	Auswirkung auf Proteinfunktion
6.	BRCA2	WZ8	10	NM_000059	289	AAT→CAT	N→H	12/17	0,7	hetero	bekannt	
		WZ8	11	NM_000059	991	AAC→GAC	N→D	9/22	0,41	hetero	bekannt	
7.	CSB (ERCC6)	223	5	NM_000124	399	GGT→GAT	G→D	3/6	0,5	hetero	bekannt	
		WZ4	18	NM_000124	1097	ATG→GTA	M→V	7/7	1	homo	bekannt	
		WZ8						7/10	0,7	hetero		
		WZ9						12/12	1	homo		
		23						19/19	1	homo		
		184						9/16	0,56	hetero		
		223	5/13	0,38	hetero							
		WZ4	18	NM_000124	1213	AGA→GGA	R→G	12/13	0,92	homo	bekannt	
		WZ8						13/23	0,56	hetero		
		WZ9						9/9	1	homo		
		23						15/16	0,94	homo		
		184						10/19	0,52	hetero		
		223	3/6	0,5	hetero							
		WZ4	21	NM_000124	1413	CAG→CGG	Q→R	6/6	1	homo	bekannt	
		WZ8						7/13	0,54	hetero		
WZ9	8/8	1						homo				
23	17/17	1						homo				
184	8/18	0,44						hetero				
223	2/6	0,33	hetero									

Nr.	Gen	Probe	Exon	mRNA- Nummer	Position der Aminosäure	SNV	Aminosäure-Tausch	Anzahl von SNVs/ Reads	Ratio SNVs/Reads	Art der Variation	SNV- Status	Auswirkung auf Proteinfunktion
8.	EXO1	23	10	NM_003686	439	ACG→ATG	T→M	6/11	0,54	hetero	bekannt	
		WZ4 184 223	10	NM_003686	458	GTG→ATG	V→M	7/16	0,43	hetero	bekannt	
								5/18	0,28	hetero		
								4/7	0,57	hetero		
		WZ4 WZ8 23 184 223 333	11	NM_003686	589	GAG→AAG	E→K	6/8	0,75	hetero	bekannt	
								12/24	0,5	hetero		
3/3	1							homo				
8/19	0,42							hetero				
						7/11	0,63	hetero				
						8/16	0,5	hetero				
9.	FBH1 (FBXO18)	223	18	NM_032807	889	GCA→ACA	A→T	2/9	0,22	hetero	bekannt	
10.	GEN1	WZ1 333	5	NM_182625	189	AGT→AAT	S→N	8/16 10/25	0,5 0,4	hetero hetero	bekannt	
11.	GTF2H2	23	4	NM_001515	54	CGA→CAA	R→Q	4/19	0,21	hetero	bekannt	
12.	IGHMBP2	WZ1	14	NM_002180	879	ACG→AAG	T→K	6/12	0,5	hetero	bekannt	
		23						9/15	0,6	hetero		
		184						4/8	0,5	hetero		
		223						4/10	0,4	hetero		
		333						5/20	0,25	hetero		

Nr.	Gen	Probe	Exon	mRNA- Nummer	Position der Aminosäure	SNV	Aminosäure-Tausch	Anzahl von SNVs/ Reads	Ratio SNVs/Reads	Art der Variation	SNV- Status	Auswirkung auf Proteinfunktion
13.	LIG1	WZ1 WZ4	24	NM_000234	753	GTG→ATG	Q→M	5/9 6/15	0,56 0,4	hetero hetero	bekannt	
14.	LIG4	223 333	2	NM_002312	9	ACT→ATT	T→I	3/7 14/27	0,42 0,51	hetero hetero	bekannt	
15.	MUTYH	WZ4 23	2	NM_001293190	22	GTG→ATG	V→M	6/22 9/22	0,27 0,41	hetero hetero	bekannt	
16.	NEIL1	WZ4 184	1	NR_046311	58	CAC→CCC	H→P	1/4 1/7	0,25 0,14	hetero hetero	unbekannt	unklar
		WZ1	2	NM_001256552	157	GAG→GGG	E→G	1/4	0,25	hetero	bekannt	
		WZ1	2	NM_001256552	212	GGG→TGG	G→W	1/4	0,25	hetero	unbekannt	deletär
		223	6	NM_001256552	223	GGG→TGG	G→W	2/9	0,22	hetero	unbekannt	unklar
17.	N4BP2	WZ9	10	NM_001318359	781	GAG→GTG	E→V	11/24	0,46	hetero	bekannt	
		184	10	NM_001318359	826	CCC→TCC	P→S	8/14	0,57	hetero	unbekannt	unklar

Nr.	Gen	Probe	Exon	mRNA- Nummer	Position der Aminosäure	SNV	Aminosäure-Tausch	Anzahl von SNVs/ Reads	Ratio SNVs/Reads	Art der Variation	SNV- Status	Auswirkung auf Proteinfunktion
18.	PALB2 (FANCN)	333	4	NM_024675	559	CAA→CGA	Q→R	10/16	0,63	hetero	bekannt	neutral
		223	6	NM_024675	841	ACA→AAA	T→K	2/6	0,33	hetero	unbekannt	
		223	8	NM_024675	932	GTG→ATG	V→M	3/10	0,3	hetero	bekannt	
19.	PARP1	WZ8 333	17	NM_001618	762	GTG→GCG	V→A	6/12 2/8	0,5 0,25	hetero hetero	bekannt	
20.	POLA1	WZ8	23	NM_016937	846	GAC→TAC	D→Y	1/6	0,17	hetero	unbekannt	deletär
21.	POLD1	WZ8	7	NM_002691	255	ATG→CTG	M→L	1/4	0,25	hetero	unbekannt	deletär
		WZ4	8	NM_002691	285	CAG→CCG	Q→P	1/4	0,25	hetero	unbekannt	deletär
		WZ1	15	NM_002691	612	ATG→ATT	M→I	1/5	0,2	hetero	unbekannt	deletär
22.	POLD2	WZ1	6	NM_006230	262	GGG→GTG	G→V	1/6	0,17	hetero	unbekannt	deletär
		WZ1	7	NM_006230	316	GAG→TAG	E→STOP	1/6	0,17	hetero	unbekannt	
23.	POLE	WZ4	8	NM_006231	259	CGC→CAC	R→H	3/13	0,23	hetero	bekannt	deletär
		WZ1	31	NM_006231	1300	GGT→TGT	G→C	1/4	0,25	hetero	unbekannt	
		23 WZ1	33 49	NM_006231 NM_006231	1396 2263	AAT→AGT CAG→AAG	N→S Q→K	14/25 1/4	0,56 0,25	hetero hetero	bekannt unbekannt	

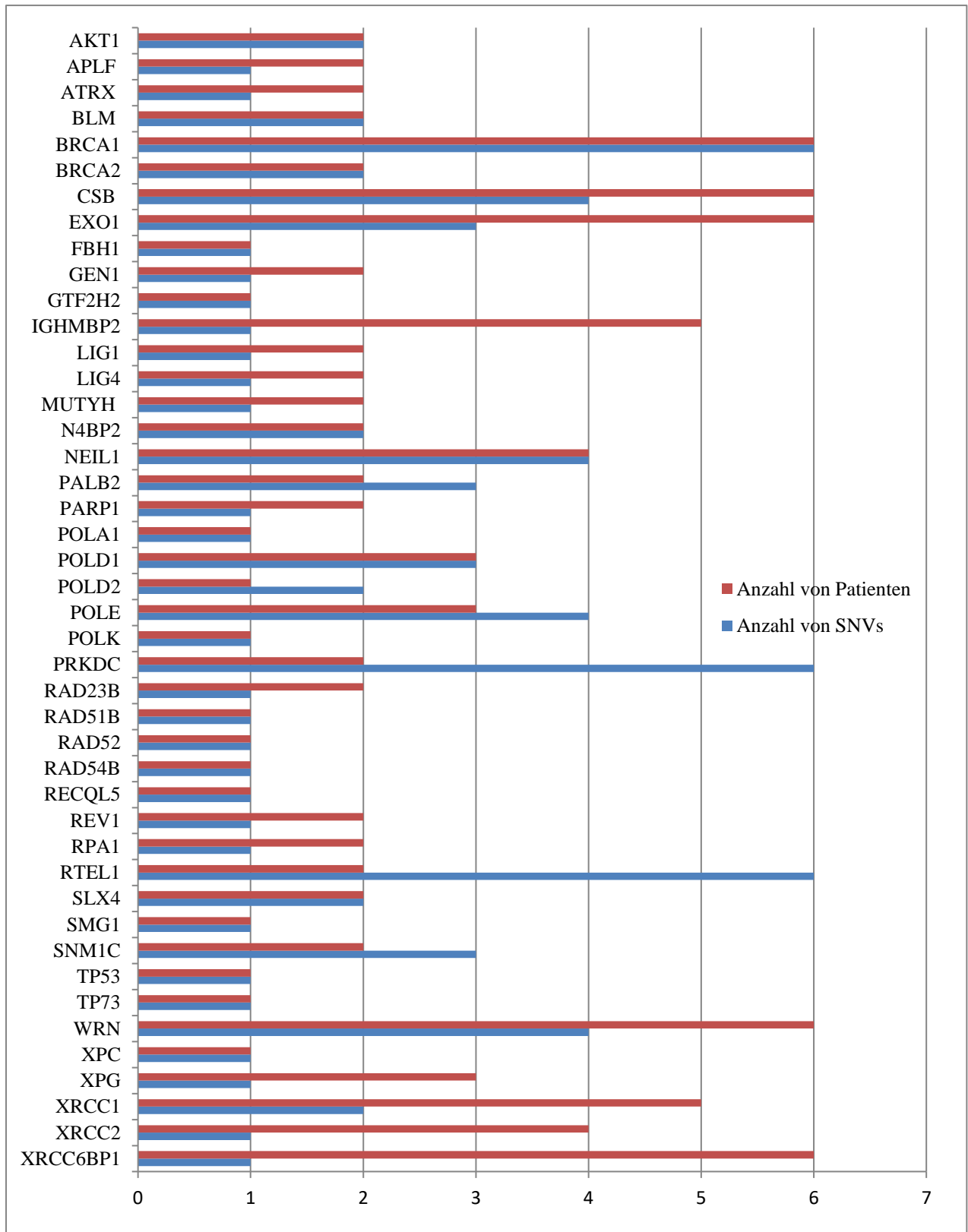
Nr.	Gen	Probe	Exon	mRNA- Nummer	Position der Aminosäure	SNV	Aminosäure-Tausch	Anzahl von SNVs/ Reads	Ratio SNVs/Reads	Art der Variation	SNV- Status	Auswirkung auf Proteinfunktion
24.	POLK	223	8	NM_016218	334	CAA→TAA	Q→STOP	1/4	0,25	hetero	unbekannt	
25.	PRKDC	223	35	NM_006904	1500	CCT→CTT	P→L	1/4	0,25	hetero	unbekannt	unklar
		WZ9	43	NM_006904	1928	GGA→GAA	G→E	9/27	0,33	hetero	bekannt	
		223	45	NM_006904	2019	GGT→TGT	G→C	2/7	0,29	hetero	unbekannt	unklar
		223	61	NM_006904	2769	GTT→TTT	V→F	1/5	0,2	hetero	unbekannt	deletär
		223	63	NM_006904	2866	GCC→GTC	A→V	1/5	0,2	hetero	unbekannt	neutral
		223	63	NM_006904	2877	GCT→ACT	A→T	1/2	0,5	hetero	bekannt	
26.	RAD23B	WZ1 333	7	NM_002874	249	GCT→GTT	A→V	8/18 5/14	0,44 0,36	hetero hetero	bekannt	
27.	RAD51B	WZ8	6	NM_133509	172	TTG→TGG	L→W	11/17	0,65	hetero	bekannt	
28.	RAD52	WZ8	6	NM_001297420	180	GGA→AGA	G→R	5/6	0,83	homo	unbekannt	unklar
29.	RAD54B	WZ1	4	NM_001205262	567	CCT→GCT	P→A	13/33	0,39	hetero	unbekannt	unklar
30.	RECQL5	WZ8	8	NM_001003716	874	AGC→ATC	S→I	6/31	0,19	hetero	unbekannt	unklar
31.	REV1	223	6	NM_016316	373	AAT→AGT	N→S	7/12	0,58	hetero homo	bekannt	
		333						16/17	0,94			

Nr.	Gen	Probe	Exon	mRNA- Nummer	Position der Aminosäure	SNV	Aminosäure-Tausch	Anzahl von SNVs/ Reads	Ratio SNVs/Reads	Art der Variation	SNV- Status	Auswirkung auf Proteinfunktion
32.	RPA1	WZ4 223	11	NM_002945	351	ACA→GCA	T→A	4/8 6/7	0,5 0,86	hetero homo	unbekannt	neutral
33.	RTEL1	WZ9	4	NM_016434	124	AAC→AGC	N→S	7/15	0,47	hetero	bekannt	
		WZ1	9	NM_016434	241	GAC→GGC	D→G	1/3	0,33	hetero	unbekannt	deletär
		WZ1	28	NM_016434	857	TCC→TAC	S→Y	1/4	0,25	hetero	unbekannt	deletär
		WZ1	28	NM_016434	859	CTG→ATG	L→M	1/4	0,25	hetero	unbekannt	neutral
		WZ1	28	NM_016434	868	GCA→GAA	A→E	1/3	0,33	hetero	unbekannt	neutral
		WZ1	35	NM_016434	1269	ACC→ATC	T→I	1/4	0,25	hetero	unbekannt	unklar
34.	SNM1C (DCLRE1C)	23	6	NM_022487	56	CCA→CGA	P→R	13/27	0,48	hetero	bekannt	
		23	8	NM_022487	128	CAT→CGT	H→R	16/31	0,52	hetero	bekannt	
		WZ9	13	NM_001350966	565	AAC→ACC	N→T	8/8	1	homo	unbekannt	unklar
35.	SLX4 (FANCP)	223	8	NM_032444	573	CCA→TCA	P→S	1/4	0,25	hetero	bekannt	
		23	12	NM_032444	862	CGA→CAA	R→Q	14/22	0,63	hetero	bekannt	
36.	SMG1	WZ1	2	NM_015092	52	GGT→AGT	G→S	7/9	0,78	hetero	bekannt	
37.	TP53	23	7	NM_001126114	238	TGT→TTT	C→F	6/7	0,86	homo	unbekannt	deletär

Nr.	Gen	Probe	Exon	mRNA- Nummer	Position der Aminosäure	SNV	Aminosäure-Tausch	Anzahl von SNVs/ Reads	Ratio SNVs/Reads	Art der Variation	SNV- Status	Auswirkung auf Proteinfunktion
38.	TP73	WZ9	12	NM_005427	486	CCC→CAC	P→H	6/15	0,4	hetero	bekannt	
39.	WRN	WZ1	2	NM_000553	32	AAG→AGG	K→R	17/21	0,81	homo	bekannt	
		WZ9 223	4	NM_000553	114	GTT→ATT	V→I	9/21 5/14	0,43 0,36	hetero hetero	bekannt	
		WZ4 WZ9 23	9	NM_000553	387	ATG→ATA	M→I	9/14 8/18 8/17	0,64 0,44 0,47	hetero hetero hetero	bekannt	
		WZ8	32	NM_000553	1262	ACA→AGA	T→R	8/23	0,35	hetero	bekannt	
40.	XPC	223	2	NM_004628	48	CTC→TTC	L→F	1/2	0,5	hetero	bekannt	
41.	XPG (ERCC5)	WZ1 WZ8 333	23	NM_001204425	1558	GAT→CAT	D→H	9/22 7/19 11/18	0,41 0,37 0,61	hetero hetero hetero	bekannt	
42.	XRCC1	WZ1 23 333	6	NM_006297	194	CGG→TGG	R→W	3/7 11/17 4/13	0,43 0,65 0,31	hetero hetero hetero	bekannt	
		WZ8 WZ9	9	NM_006297	280	CGT→CAT	R→H	9/18 5/10	0,5 0,5	hetero hetero	bekannt	

Nr.	Gen	Probe	Exon	mRNA- Nummer	Position der Aminosäure	SNV	Aminosäure-Tausch	Anzahl von SNVs/ Reads	Ratio SNVs/Reads	Art der Variation	SNV- Status	Auswirkung auf Proteinfunktion
43.	XRCC2	WZ1 WZ8 WZ9 223	3	NM_005431	188	CGC→CAC	R→H	22/31 17/24 7/13 3/8	0,71 0,71 0,54 0,38	hetero hetero hetero hetero	bekannt	
44.	XRCC6BP1	WZ1 WZ4 23 184 223 333	1	NM_033276	48	AGC→TGC	S→C	4/8 2/11 4/10 8/10 9/12 8/13	0,5 0,18 0,4 0,8 0,75 0,61	hetero hetero hetero homo hetero hetero	unbekannt	neutral

Abbildung 8 Häufigkeit von SNVs in Abhängigkeit des Gens



x-Achse: Anzahl von Patienten und SNVs, y-Achse: Gene mit gefundenen SNVs. Nur bei einem Gen (XRCC6BP1) wurde bei 6 von 8 Patienten derselbe, unbekannte SNV gefunden.

Bei aufgereinigten Lymphomzellproben von acht Sézary Syndrom Patienten konnten 86 SNVs in 44 (33,8%) von 130 Genen gefunden werden. 54 SNVs (62,8%) waren bereits vorbeschrieben (SNPs), 32 (37,2%) bislang unbekannt. Bei 84 SNVs (97,7%) lag eine Missense-Variation, bei 2 (2,3%) eine Nonsense-Variation vor. Die Nonsense-Veränderungen wurden nur bei 2 unbekanntem SNVs (Gene: POLD2 und POLK) gefunden. Diese traten allerdings bei jeweils einem Patienten auf.

Die Art der Veränderungen bei bekannten und unbekanntem SNVs wurde in der Tabelle 7 dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf missense/nonsense, homozygote/heterozygote Veränderung konnte nicht festgestellt werden.

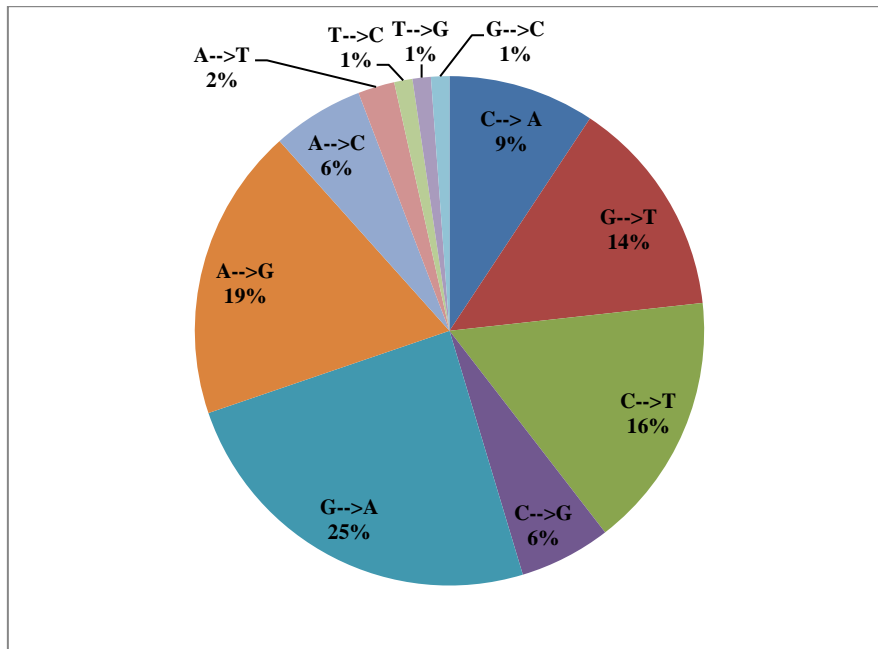
Tabelle 7

Art der Veränderung	SNVs		p-Wert
	bekannt	unbekannt	
missense	54 (100%)	30 (93,8%)	0,800
nonsense	0	2 (6,2%)	
homozygote	18 (14,9%)	5 (12,8%)	0,297
heterozygote	103 (85,1%)	34 (87,2%)	

Bei den untersuchten Genen wurden maximal 6 SNVs pro Gen gefunden. Bei 3 Genen (BRCA1, PRKDC, RTEL1) lag eine maximale SNVs-Anzahl (6) vor; bei BRCA1 bei 6 Patienten, bei PRKDC und RTEL1 bei 2 Patienten. Bei 5 Genen (BRCA1, CSB, EXO1, WRN und XRCC6BP1) konnten SNVs bei 6 Patienten (75%) festgestellt werden. Nur bei einem Gen (XRCC6BP1) wurde derselbe, unbekanntem SNV identifiziert.

Die Nukleotid-Änderungen bei SNVs zeigt die Abbildung 10. Die Häufigste Nukleotid-Änderung war G→A.

Abbildung 9 Nukleotid-Änderungen bei SNVs



Die häufigste Nukleotid-Änderung war mit 25% Umtausch von Guanin durch Adenin. A-Adenin, C-Cytosin, G-Guanin, T-Thymin.

5.3 SNVs bei Patienten

In der Tabelle 8 wurden Gene mit gefundenen SNVs bei einzelnen Patienten aufgelistet. In der Klammer wurde die Anzahl von SNVs in jedem einzelnen Gen angegeben.

Tabelle 8

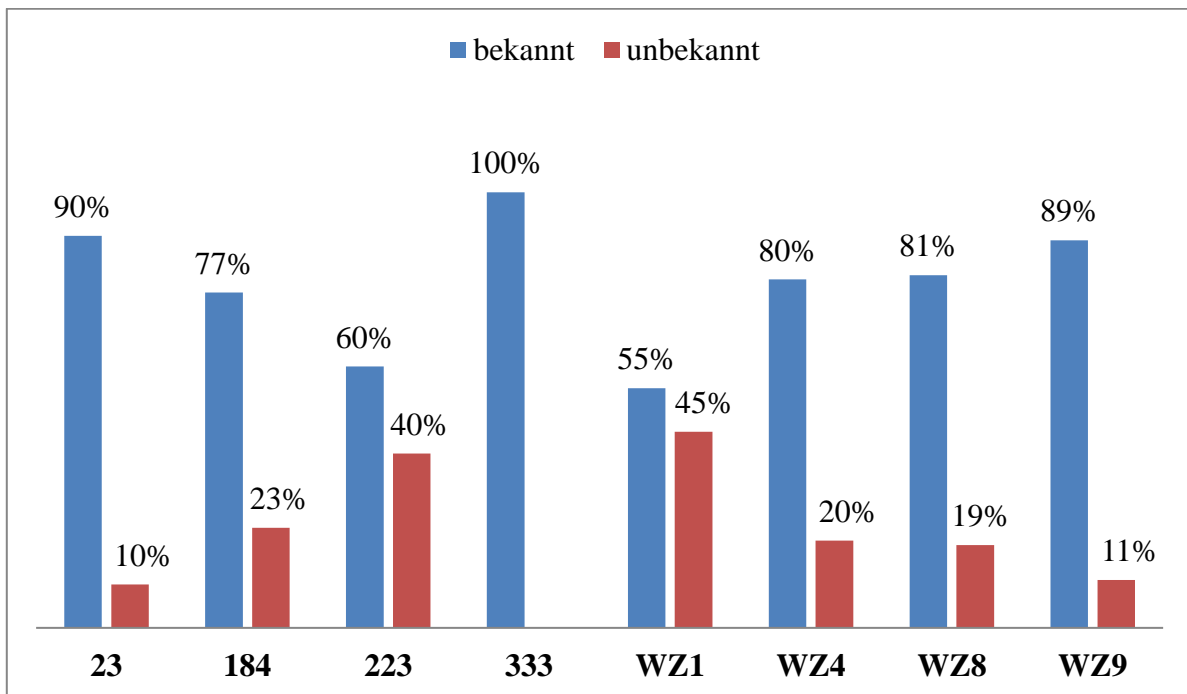
Patient	Anzahl von Genen mit SNVs	Gene mit SNVs
23	14	ATRX(1), BRCA1(4), CSB(3), EXO1(2), GTF2H2(1), IGHMBP2(1), MUTYH(1), POLE(1), SNM1C(2), SLX4(1), TP53(1), WRN(1), XRCC1(1), XRCC6BP1(1)
184	7	BRCA1(4), CSB(3), EXO1(2), IGHMBP2(1), NEIL1(1), N4BP2(1), XRCC6BP1(1)
223	16	CSB(4), EXO1(2), FBH1(1), IGHMBP2(1), LIG4(1), NEIL1(1), PALB2(2), POLK(1), PRKDC(5), REV1(1), RPA1(1), SLX4(1), WRN(1), XPC(1), XRCC2(1), XRCC6BP1(1)
333	11	EXO1(1), GEN(1), IGHMBP2(1), LIG4(1), PALB2(1), PARP1(1), RAD23B(1), REV1(1), XPG(1), XRCC1(1), XRCC6BP1(1)
WZ1	20	AKT1(1), ATRX(1), BLM(2), BRCA1(4), GEN1(1), IGHMBP2(1), LIG1(1), NEIL1(2), POLD1(1), POLD2(2), POLE(2), RAD23B(1), RAD54B(1), RTEL1(5), SMG1(1), WRN(1), XPG(1), XRCC1(1), XRCC2(1), XRCC6BP1(1)
WZ4	13	APLF(1), BLM(2), BRCA1(4), CSB(3), EXO1(2), LIG1(1), MUTYH(1), NEIL1(1), POLD1(1), POLE(1), RPA1(1), WRN(1), XRCC6BP1(1)
WZ8	15	APLF(1), BRCA1(5), BRCA2(2), CSB(3), EXO1(1), PARP1(1), POLA1(1), POLD1(1), RAD51B(1), RAD52(1), RECQL5(1), WRN(1), XPG(1), XRCC1(1), XRCC2(1)
WZ9	11	AKT1(1), BRCA1(5), CSB(3), N4BP2(1), PRKDC(1), RTEL1(1), SNM1C(1), TP73(1), WRN(2), XRCC1(1), XRCC2(1)

In der Tabelle 9, Abbildung 10 und 11 wurden die SNVs mit weiterer Anteilung missense/nonsense, bekannt/unbekannt, homozygot/heterozygot bei Patienten dargestellt.

Tabelle 9

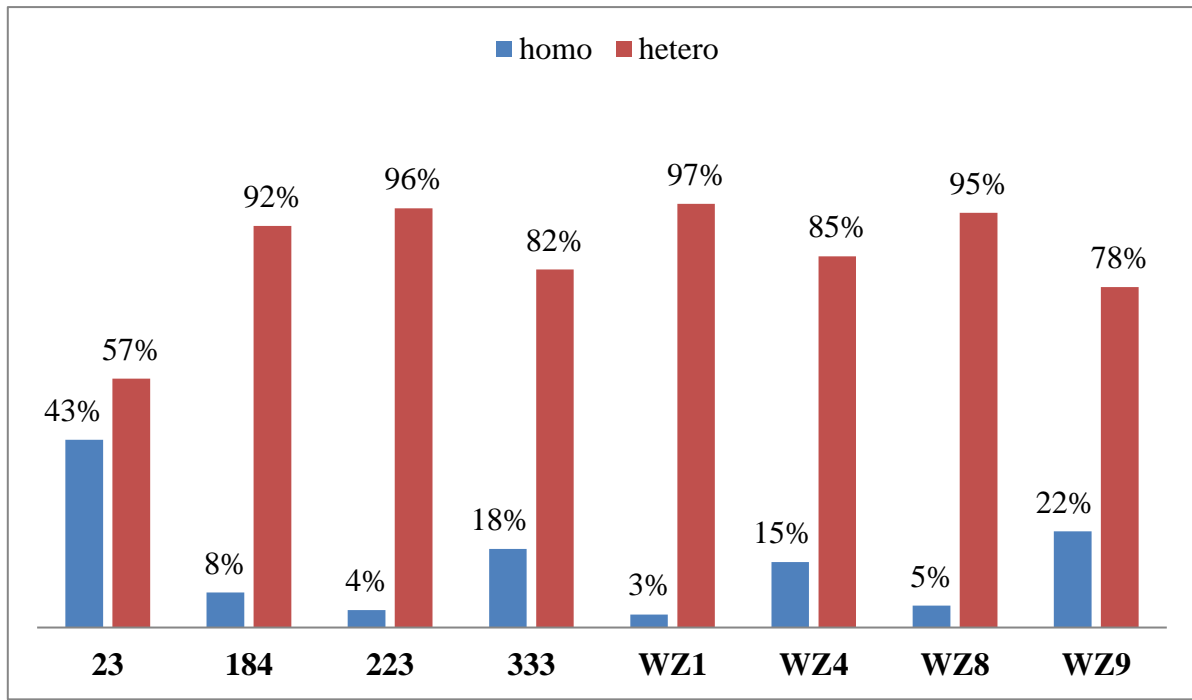
<i>Patient</i>	<i>Anzahl von SNVs</i>	<i>missense</i>	<i>nonsense</i>	<i>p-Wert</i>	<i>bekannt</i>	<i>unbekannt</i>	<i>p-Wert</i>	<i>homo</i>	<i>hetero</i>	<i>p-Wert</i>
23	21	21	0	~1	19	2	0,018	9	12	0,003
184	13	13	0		10	3		1	12	
223	25	24	1		15	10		1	24	
333	11	11	0		11	0		2	9	
WZ1	31	30	1		17	14		1	30	
WZ4	20	20	0		16	4		3	17	
WZ8	22	22	0		18	4		1	21	
WZ9	18	18	0		16	2		4	14	

Abbildung 10 Bekannte und unbekannte SNVs bei Patienten



x- Achse: Patienten, y-Achse: prozentueller Anteil von bekannten und unbekanntem SNVs

Abbildung 11 Homo- und heterozygote SNVs bei Patienten



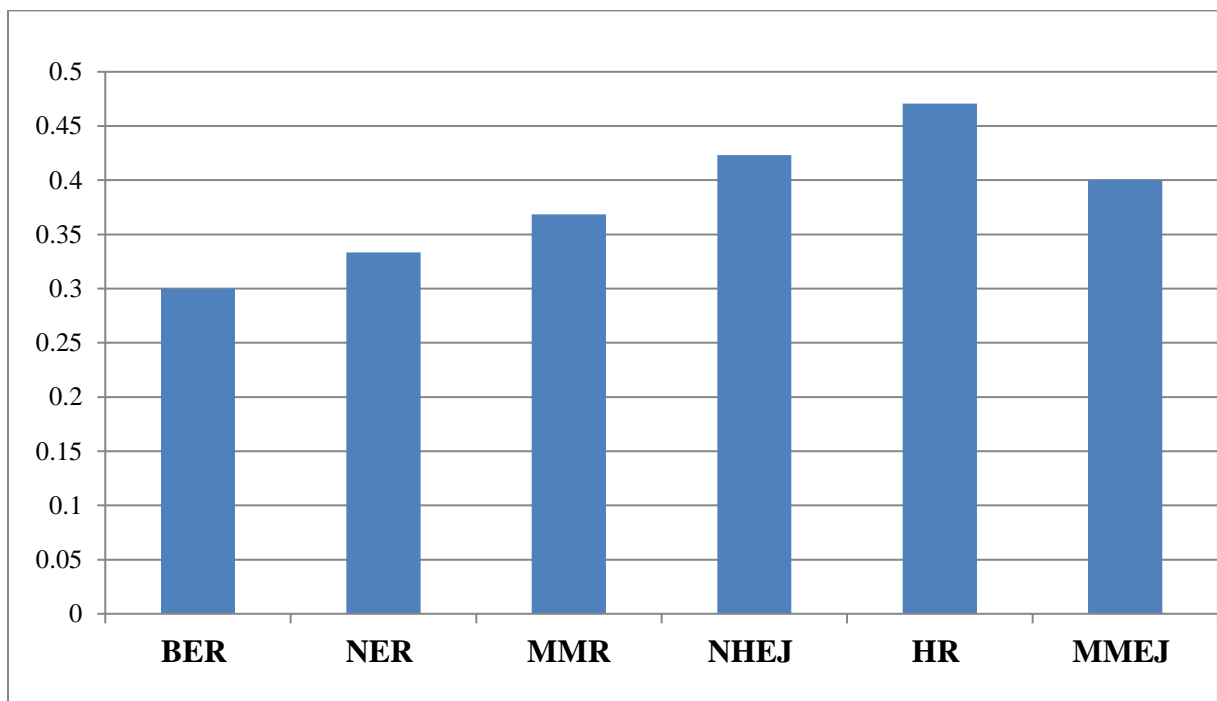
x-Achse: Patienten, y-Achse: prozentueller Anteil von homozygoten und heterozygoten SNVs

Bei Patienten konnten zwischen 11 und 31 SNVs (durchschnittlich 20) in 7 bis 20 (durchschnittlich 13) Genen gefunden werden. Die Mehrheit der nachgewiesenen SNVs waren bei allen Patienten Missense-, bekannte und a. e. heterozygote Variationen. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden zwischen den Patienten hinsichtlich der bekannten/unbekannten und homozygoten/heterozygoten Variationen ($p < 0,05$). Patienten 223 und WZ1 wiesen häufiger unbekannte Veränderungen auf, aber ohne statistische Signifikanz. In der post-hoc Analyse konnte festgestellt werden, dass beim Patienten 23 statistisch signifikant häufiger homozygote Veränderungen im Vergleich zum Patienten 223, WZ1 und WZ8 auftraten. Im Vergleich zu den übrigen Patienten konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

5.4 SNVs bei DNA-Reparaturmechanismen

Abbildung 12 zeigt die Häufigkeit von Genen mit SNVs in Abhängigkeit von den verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen. Diese Häufigkeit wurde an die Anzahl von Genen, die an einem Reparatur-Weg beteiligt ist, angepasst (Verhältnis von Anzahl von Genen mit SNVs und Anzahl von Genen bei einem Reparaturmechanismus). Zellzyklus/Apoptose sowie epigenetische Regulation wurden aufgrund der geringen Häufigkeit der betroffenen Genen (0,08 und 0,14) nicht in Betracht gezogen.

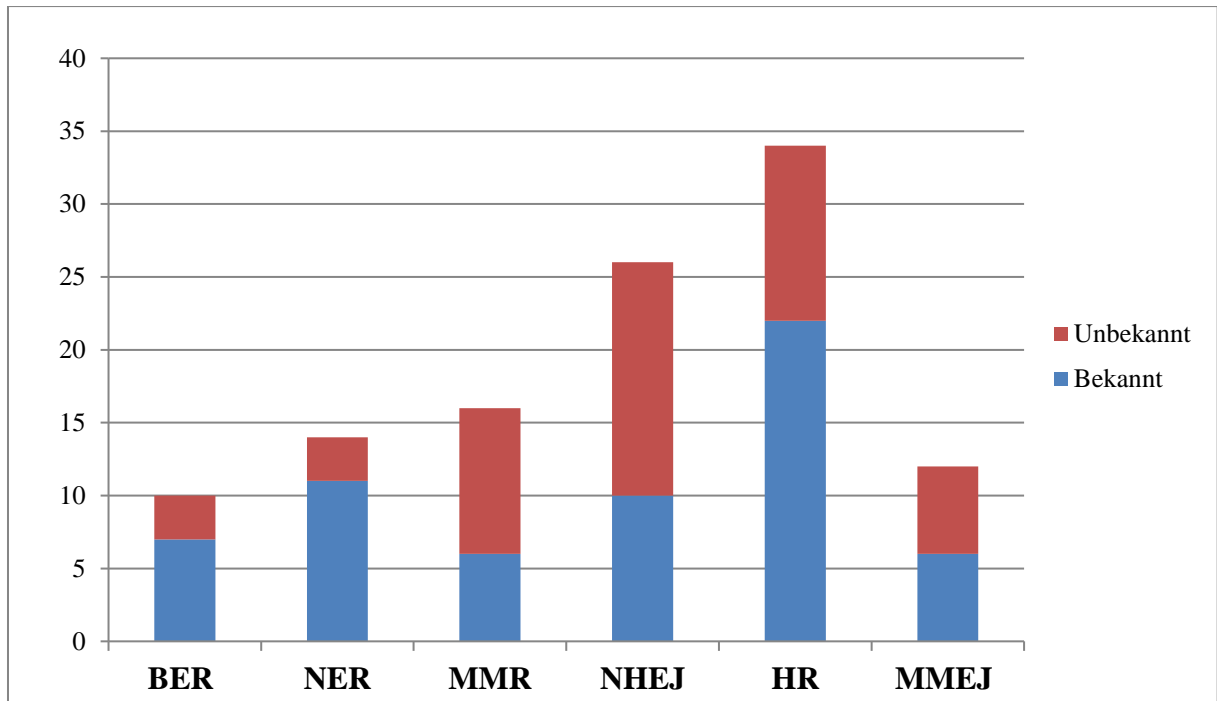
Abbildung 12 Häufigkeit von Genen mit gefundenen SNVs bei DNA-Reparaturmechanismen



*x-Achse: DNA-Reparaturmechanismen (BER=Basen-Exzisionsreparatur, NER=Nukleotid-Exzisionsreparatur, MMR=Mismatch-Reparatur, NHEJ=nicht homologe Endverknüpfung; non-homologous end-joining, HR=homologe Rekombination, MMEJ=microhomology-mediated end joining),
y-Achse: Verhältnis zwischen Anzahl von Genen mit gefundenen SNVs und Anzahl von an einem Reparaturweg beteiligten Genen*

In der Abbildung 13 wurden die SNVs (bekannt oder unbekannt) getrennt nach einzelnen DNA-Reparaturwegen dargestellt.

Abbildung 13 Anzahl von SNVs bei DNA-Reparaturmechanismen



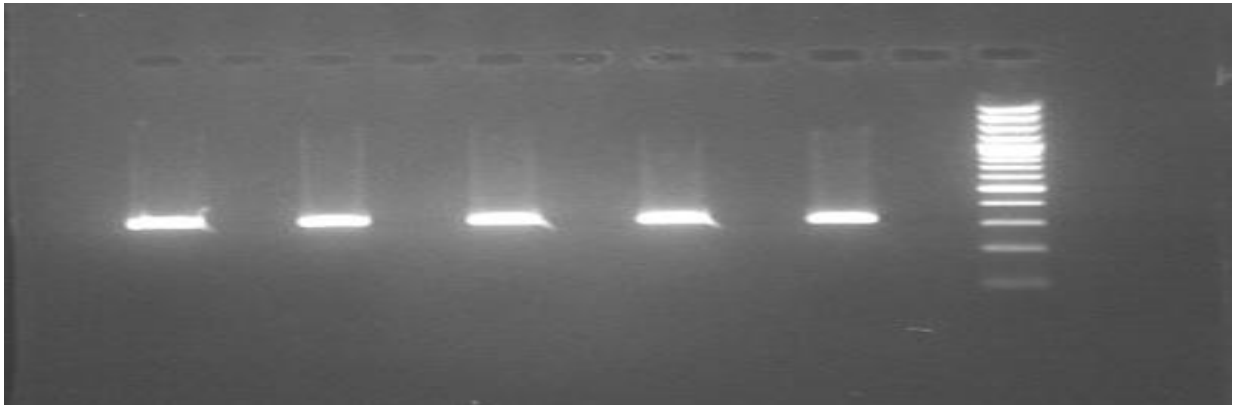
x- Achse: DNA-Reparaturmechanismen (BER=Basen-Exzisionsreparatur, NER=Nukleotid-Exzisionsreparatur, MMR=Mismatch-Reparatur, NHEJ=nicht homologe Endverknüpfung, non-homologous end-joining, HR=homologe Rekombination, MMEJ= microhomology-mediated end joining), y-Achse: Anzahl von gefundenen SNVs mit Einteilung unbekannt/bekannt

Die häufigsten Veränderungen traten bei Genen, die an homologer Rekombination beteiligt sind, auf. Bei Genen von MMR konnten am meisten unbekannte SNVs (62,5%) im Vergleich zu anderen Reparaturwegen gefunden werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von Mechanismen ($p=0,096$) sowie Anzahl von bekannten/unbekannten SNVs bei Mechanismen ($p=0,094$) wurde nicht gefunden.

5.5 Amplifizierung der DNA von gesunden Spendern

Da es nur bei einem Gen XRCC6BP1 bei 6 von 8 Sézary Syndrom Patienten derselbe und unbekannte SNV Ser48→Cys48 festgestellt werden konnte, wurde geprüft, ob dieser SNV in einer gesunden Population vorhanden ist. Zunächst wurde hierzu eine DNA-PCR von 29 gesunden Spendern durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Amplifikate wurde in der Abbildung 14 dargestellt.

Abbildung 14 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Amplifikate



Mittels DNA-Ladder von 100 bp konnten DNA-Fragmente von 320bp Länge identifiziert werden.

5.6 Sequenzierung der DNA von gesunden Spendern

Nach der DNA-Aufreinigung konnte eine Sequenzierung durch LGC Genomics durchgeführt werden. Dabei wurde festgestellt, dass bei 14/29 (48,3%) gesunden Kontrollpersonen ein Ser48→Cys48 SNV auftritt. Bei 15 (51,7%) Kontrollpersonen war dieser SNV nicht nachweisbar.

6. Diskussion

Die molekulare Pathogenese des Sézary Syndroms bleibt trotz zahlreicher Studien unklar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte abgeschätzt werden, ob Einzelnukleotid-Variationen bei Genen der DNA-Reparaturwege, Zellzyklus-Kontrolle, epigenetischer Regulation in Proben von 8 Patienten mit Sézary Syndrom im Vergleich zu gesunden Probanden gehäuft beobachtet werden. Diese Veränderungen können die Gen-Funktion und damit die Mechanismen beeinflussen, was zur Entwicklung von transformierten T-Zellen führen könnte.

Caprini et al. konnten nach einer Genom-Analyse bestätigen, dass sich ein Allel-Ungleichgewicht („allelic imbalance“) bei SéSy, ähnlich wie bei anderen Krebserkrankungen, als ein häufiges Merkmal darstellt. Die zytogenetischen Veränderungen (vorwiegend Verluste) traten bei 28 Patienten vor allem auf Chromosom 8, 9, 10 und 17 auf. Hierbei wurden unter anderem Störungen bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen als Erklärung für den Verlust von Heterozygotität (LOH, „loss of heterozygosity“) gesehen. Zu den 113 Genen, die sich auf oben genannten Chromosomen befinden, gehört RPA1 (beteiligt an DSB-Reparatur), Gene des TNF α /NF- κ B-Wegs (typischerweise wird dieser Weg bei kutanen T-Zell-Lymphomen aktiviert), sowie BUB3 (beteiligt am Spindelapparat-Checkpoint). Interessanterweise korrelierten nur 3 chromosomale Veränderungen (Verlust oder Gewinn) mit einer einhergehenden schlechten Prognose (75).

Ebenso wurde durch Xin et al. gehäuft LOH an fast allen Chromosomen (insbesondere 9, 10 und 13) mit Veränderungen an der SNP-Kopien-Anzahl festgestellt. Hierbei wurde vor allem der Verlust am FAT-Gen (Suppressorgen) gefunden (76).

In der ersten großen Genom-Analyse von 37 SéSy-Patienten konnte durch Wang et al. gezeigt werden, dass die Mutationsfrequenz mit einer Exposition an UVB-Strahlung, zusammenhängt. Die Mutationen wurden hauptsächlich in 3 Mechanismen (epigenetische Regulation, T-Zell Signalweg, Zellzyklus-Kontrolle, vor allem Zellzyklus-Checkpoints) gefunden (77).

Woollard et al. untersuchte auf der Suche nach spezifischen Mutationen („drivers genes“) mittels next-generation Sequenzierung Genome von 10 SéSy-Patienten. In einem zweiten Schritt wurden die DNA-Proben von 101 weiteren Patienten auf bestimmte Veränderungen sequenziert. Bei über 50% der Fälle konnten Einzelnukleotid-Varianten und Kopien-Anzahl-Varianten („copy number variants“) in Genen der DNA-Reparaturwege und der Telomerenfunktion identifiziert werden. Es wurde vermutet, dass Fehler bei der

Zellykluskontrolle (TP53), der Telomerenfunktion (POT1/ATM) und der DNA-Reparatur-Initiation (BRCA2) zur genomischen Instabilität führt, was ein Merkmal des SéSy ist. Andere Veränderungen wurden ebenso in Genen des TCR/NF- κ B-Weges und in an epigenetischer Regulation beteiligten Genen identifiziert (78).

Ähnliche Ergebnisse konnten durch Prasad et al. erhoben werden. Bei 15 SéSy-Patienten wurden Veränderungen (somatische Punktmutationen, Kopienanzahl-Variationen, Fusionsgene) bei Genen von T-Zell-Signaltransduktion (CARD11), -Differenzierung (IL6, RIPK2, RAG, ZEB1, TYK2), -Aktivierung (CBLB) und -Proliferation, NF κ B-Weg, Apoptose (DAD1, HK1), DNA-Reparatur (ATM) gefunden. Die häufigsten Veränderungen betrafen TP53 bei 58% Patienten (79, 80).

Zusammenfassend wird vermutet, dass Genveränderungen in verschiedenen zentralen Bereichen der Zellreplikation und der genomischen Integrität zu malignen Transformation von T-Zellen und damit zu der Entwicklung von SéSy führen. Zu diesen gehören Veränderungen des Genoms (Mutationen, Kopien-Anzahl-Variationen), Störungen bei der Transkription (erhöhte oder erniedrigte Expression von Tumorsuppressor- oder Onkogenen, Fusionstranskripte) sowie epigenetische Modifikationen (Methylierung, Histonen-Modifikation). Trotz zahlreicher Studien konnte bis jetzt nicht festgestellt werden, welche Veränderungen die maligne Transformation initiieren und zu einer klonalen Expansion der betroffenen Zellen führen („driver mutations“), und welche im Verlauf der Erkrankung entstehen aber für die Entwicklung und den Verlauf der Erkrankung eine untergeordnete Rolle spielen („passenger mutations“). Überdies wird vermutet, dass multifaktorielle Mechanismen zur Entwicklung des SéSy führen (81).

6.1 SNVs in ausgewählten Genen

Für die vorliegende Arbeit wurden zunächst Gene verschiedener für die Tumorentstehung potentiell relevanter Mechanismen (Zellzyklus-Regulation, Apoptose, DNA-Reparatur, epigenetische Modifikationen) auf Basis der bereits bestehenden Literatur ausgewählt. Da in früheren Publikationen zu genetischen Veränderungen bei SéSy-Patienten sehr viele unterschiedliche Signalwege untersucht wurden, wurde es sich in der vorliegenden Arbeit insbesondere auf Gene der DNA-Reparatur konzentriert. Zu beachten ist, dass einige Schritte der DNA-Reparaturwege ähnlich oder identisch verlaufen, wodurch einige Gene an mehr als nur einem DNA-Reparaturweg beteiligt sind. Dies betrifft z. B. EXO1, MRE11, PCNA, RAD.

Gene mit maximaler Anzahl von SNVs

Bei 3 Genen (BRCA1, PRKDC, RTEL1) wurde eine maximale Anzahl (6) von SNVs gefunden. Nur bei BRCA1 traten die SNVs bei 6 von 8 Patienten auf und alle waren bekannt. Dieses Gen kodiert ein Protein, das als ein wichtiger Regulator der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen via homologe Rekombination gilt. Überdies interagiert es mit Tumorsuppressor- und Onkogenen, Zellzyklus-regulierenden Proteinen sowie Aktivatoren/Repressoren der Transkription. Die in unserer Arbeit nachgewiesenen Missense-Varianten wie D693N, P871L, E1038G, K1183R und M1652I wurden bereits bei Patientinnen mit Mammakarzinom beschrieben. Obwohl diese sich nicht in einem funktionellen Bereich des Gens befinden und als neutrale Veränderungen bezüglich der Proteinfunktion gelten, können sie die Genexpression durch eine Auswirkung auf Bindung von Transkriptionsfaktoren an einer Promotorregion beeinflussen. Ein erniedrigtes Mammakarzinom-Risiko wurde bei Trägerinnen des K1183R SNP festgestellt (82). Das Allel T bei SNP P871L wurde als ein Risikofaktor für den Progress bei triple-negativem Mammakarzinom nach Strahlentherapie identifiziert (83). Andererseits soll es mit einem besseren Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie und mit einem längeren Gesamtüberleben bei nicht kleinzelligem Lungenkarzinom assoziiert sein (84). Der SNP S1613G ist mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit lokal-fortgeschrittenem Pankreaskarzinom in der chinesischen Population verbunden (85).

Die Studien-Ergebnisse bezüglich des Einflusses von BRCA1-Polymorphismen auf das Krebsrisiko sind teilweise widersprüchlich. In einer Meta-Analyse von 35 Studien durch Xu et al. wurde festgestellt, dass der SNP P871L mit einem erniedrigten Risiko für Zervixkarzinome, Plattenepithelkarzinome des Ösophagus, Non-Hodgkin Lymphome und Magenkarzinome in einer chinesischer Population verbunden sein könnte. Der Nukleotidaustausch CCG→CTG beeinflusst möglicherweise eine Interaktion zwischen miR-638 (mikroRNA) und BRCA1-mRNA, was zu einer erhöhten Expression dieses Gens bei T-Allel-Trägern führt. Das Vorhandensein von E1038G könnte wiederum das Risiko von Krebserkrankungen in kaukasischer Population erhöhen. Ein Zusammenhang zwischen Krebsrisiko und S1613G wurde nicht gefunden (86).

Die SNPs D693N und M1652I traten nur bei jeweils einem Patienten auf. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle der in der vorliegenden Studie gefundenen SNPs in BRCA1 bei Entstehung von Krebserkrankung weiterhin unklar bleibt. Das Vorhandensein von nur einem SNP (E1038G) könnte laut Studien die Entstehung von Krebserkrankungen begünstigen (86).

PRKDC kodiert eine Untereinheit von einer DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs). Diese interagiert mit einem Ku70/Ku80 Heterodimer und bildet einen DNA-Reparaturkomplex bei NHEJ. Überdies ist DNA-PKcs bei der Zellzyklusprogress-Regulation involviert (G2/M-Arrest). Eine pharmakologische Inhibition von DNA-PKcs führt zur Überempfindlichkeit auf Bestrahlung sowohl bei embryonischen Fibroblasten der Maus (MEF), als auch bei humanen Zellen von Nasopharynxkarzinomen. Das Ausmaß der Beeinträchtigung der DSB-Reparatur und der Induktion eines Zellzyklus-Arrests ist dabei ähnlich wie bei Ku70^{-/-} Zellen (87, 88). 5 von 6 gefundenen SNVs bei PRKDC traten bei einem Patienten (223) auf. 4 SNVs von diesen waren unbekannt, aber nur 1 (V2769F) kann laut PROVEAN einen negativen Einfluss auf die Proteinfunktion haben.

RTEL1 kodiert eine Helikase, die eine wesentliche Rolle bei der Telomerlängen-Kontrolle sowie bei homologer Rekombination spielt. Sie erkennt Verbindungen zwischen ssDNA und dsDNA bei D-loops und verfügt über eine 5' zu 3'-Aktivität. Einige SNPs von RTEL1 sind mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Gliomen, Astrozytomen, Glioblastomen, sowie von dem Hoyeraal-Hreidarsson-Syndrom (Knochenmarkversagen, Dyskeratosis congenita) verbunden (89, 90). Zu diesen gehört allerdings nicht der in der vorliegenden Arbeit identifizierte, einzige bekannte SNV. Die 5 anderen gefundenen SNVs waren unbekannt und traten, ähnlich wie bei PRKDC, nur bei einem Patienten (WZ1) auf. Laut PROVEAN haben 2 SNVs (D241G, S857Y) einen negativen Einfluss auf die Proteinfunktion. In der SIFT-Analyse gilt dies nur für D241G.

Gene mit SNVs, die gehäuft bei SéSy-Patienten nachweisbar waren

Bei 5 Genen (BRCA1, CSB, EXO1, WRN, XRCC6BP1) wurden SNVs bei 6 von 8 (75%) Patienten gefunden. CSB (ERCC6) kodiert ein Protein, was eine wesentliche Rolle bei NER während der Transkription spielt. NER ist ein Reparatur-Hauptmechanismus der durch UV-Bestrahlung verursachten DNA-Läsionen (CC→TT). Das Protein CSB verändert lokal die DNA-Struktur, wodurch eine RNA-Polymerase II, die an Stellen mit DNA-Läsionen blockiert wird, ihre Funktion fortführen kann. Des Weiteren wird es für Bildung eines Reparaturkomplexes während der Transkription gebraucht und fördert die Rekrutierung anderer NER-Proteine. Ein Knockdown von CSB führt bei humanen Keratinozyten zur mangelhaften Reparatur von durch UV verursachten DNA-Läsionen, sodass eine Rolle von CSB bei Kanzerogenese von Tumoren der Haut vermutet wird. Für die beiden in der vorliegenden Studie gefundenen SNPs (R1213G und Q1413R) konnte eine Assoziation mit einem erhöhten Risiko für Basalzellkarzinome der Haut gezeigt werden (91). Bei 3 von 8

Patienten (WZ4, 23, 184) traten bei 3 SNPs a. e. homozygote Varianten auf. Diese hohe Häufigkeit von homozygoten Varianten konnte nur bei CSB gefunden werden. Andererseits waren nur 33% der NER-Gene (5. Position bei DNA-Reparaturmechanismen in Bezug auf die Häufigkeit der Gene mit gefundenen SNVs) betroffen. Des Weiteren trat bei allen SNVs nicht C→T (typische Veränderung nach UVB-Strahlung), sondern A→G auf. In der Arbeit von Wang et al. wurden UVB-charakteristische Veränderungen bei 30% Patienten festgestellt. Es ergab sich keine Korrelation zwischen Häufigkeit von diesen und vorherigen UV-Therapien sowie der Krankheitsgeschichte (Entstehung de novo vs aus Mycosis fungoides). Dadurch wurde die Behauptung, dass die transformierten T-Zellen aus „central memory“ und nicht aus „resident-memory“ T-Zellen entstehen, in Zweifel gebracht. Man kann vermuten, dass DNA-Veränderungen, die mit dem Alter auftreten und akkumulieren, eine zusätzliche Rolle bei der Pathogenese von SéSy spielen können (77).

Die Exonuclease 1 (EXO1) gehört zum MMR-System und zur RAD2/XPG-Familie von Nukleasen. Das kodierte Protein interagiert mit MMR-Proteinen (MLH1 und MSH2), bildet mit diesen einen ternären Komplex, der DNA-Mismatches erkennt und ist an Replikation, homologer Rekombination, sowie an der DSB-Reparatur beteiligt. Die Mutationen von EXO1 wurden bei Prostatakarzinom gefunden. Der nur bei einem Patienten (23) gefundene SNP T439M ist mit einem Anstieg vom PSA (Prostata-spezifischer Antigen) im Rahmen des „biochemischen Rezidivs“ nach stattgehabter Strahlentherapie bei Patienten mit Prostatakarzinom assoziiert (92). Der andere SNP E589K wurde bei 6 Patienten identifiziert. Er könnte mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Gliomen, Lungen-, Brust-, Magen- und Kolorektalkarzinomen, sowie mit einem erhöhten Krebsrisiko bei Rauchern vergesellschaftet sein. Das Risiko ist allerdings von der untersuchten Population abhängig und wurde vor allem bei Patienten asiatischer Herkunft gefunden (93, 94). Der dritte SNP V458V wurde bei 3 Patienten gefunden. Seine klinische Bedeutung ist bis dato unbekannt.

WRN reguliert, ob NHEJ als ein klassischer oder alternativer Weg verläuft. Das Protein verfügt über eine Helikase- sowie Exonuklease-Aktivität. Nach der Bindung an DSB-Stellen hemmt es die Rekrutierung von MRE11 und CtIP und schützt die DNA-5'-Endungen vor einer Resektion. Überdies ist WRN bei der Replikation beteiligt: es behebt eine Polymerase-Blockierung an DNA-Läsionen und bildet einen Replikationskomplex mit dieser. Ein Knockdown von WRN bei MEF führt zur Telomerenfusion (95). Die Mutationen bei WRN gehen mit erhöhtem Risiko für Sarkome, Melanome, Schilddrüsenkarzinome und Leukämien einher. In einer Studie mit 1172 Patienten wurde gezeigt, dass er wiederum mit einem erniedrigten Risiko für Non-Hodgkin-Lymphome verbunden war (96). Der bei 2 Patienten

gefundene SNP V114I erhöht die hämatotoxische Wirkung von Benzol (97). Für die anderen in unserer Studie gefundenen SNPs ist bis dato keine klinische Bedeutung bekannt.

XRCC6BP1, auch ATP23 oder KUB3 genannt, ist bei NHEJ beteiligt. Das Protein interagiert mit einem Ku70/Ku80 Heterodimer, welcher DSBs erkennt. Dadurch wird eine katalytische Untereinheit von DNA-PKcs, XLF und XRCC4-DNA Ligase IV-Komplex rekrutiert, so dass weitere Schritte der DNA-Reparatur erfolgen können. Möglicherweise gehört KUB3 nicht zum Teil des DNA-PK Komplexes, sondern spielt eine regulatorische Funktion. Eine Amplifikation von XRCC6BP1, die zu Gen-Überexpression, gesteigerter Zellenproliferation sowie gesteigerter DNA-Reparatur nach Bestrahlung führt, wurde bei Glioblastoma multiforma gefunden (98, 99).

Der SNV AGC→TGC mit konsekutivem Aminosäuretausch Serin→Cystein an der 48. Position wurde bei 6 von 8 (75%) Patienten identifiziert. Zum Zeitpunkt der Recherche von Genen (2014) galt diese Veränderung nach der Prüfung in der SNPs-Datenbank von NCBI („National Center for Biotechnology Information“) als „unbekannt“. Deshalb stellten wir die Hypothese auf, dass dieser SNV eine Funktion des kodiertem Proteins und somit das NHEJ beeinträchtigt, was möglicherweise zur malignen T-Zell-Transformation führt. Aus diesem Grund wurde geprüft, ob dieser SNV in einer gesunden Population nachweisbar ist. Es zeigte sich, dass er bei 14/29 (48,3%) gesunden Kontrollpersonen gefunden werden konnte. Im Vergleich zu den SéSy-Patienten war diese Häufigkeit geringer, was aber möglicherweise durch die geringe Fallzahl sowohl in der Gruppe der SéSy-Patienten als auch in der Kontrollgruppe erklärbar ist. Mittlerweile konnte der SNV anhand Daten der NCBI als „bekannt“ identifiziert werden, wobei die Häufigkeit von einem T-Allel zwischen 0,2536 und 0,3582 lag, somit deutlich geringer. Ob dieser SNP tatsächlich häufiger bei SéSy-Patienten auftritt, müsste in größeren Patientengruppen untersucht werden. Eine klinische Bedeutung dieses SNPs bleibt weiterhin unklar. Laut PROVEAN/SIFT hat die Aminosäure-Veränderung eine neutrale Auswirkung auf die Proteinfunktion. Es ist allerdings bekannt, dass die Veränderungen, die als „neutral“ bewertet werden, die Proteinfunktion oder Gen-Expression beeinflussen können, was auch in diesem Fall ggf. weiter geprüft werden könnte.

Identifizierte SNPs bei anderen Genen

BLM, das als ein Tumor-Suppressorgen gilt, kodiert eine 3'-5'-Helikase, die zur Familie der RecQ-Helikasen gehört. Bei HR bildet sie einen Komplex mit TopoIII α und Rmi1/Rmi2, der doppelte sogenannte DNA-Hollidaystrukturen löst. Überdies bearbeitet der Komplex die DSBs, so dass 3'-Einzelstrang-Endungen entstehen, die für die DNA-Invasion bei HR

erforderlich sind. Die Mutationen von BLM (vor allem Kodon-Stop) führen zur Entwicklung des Bloom-Syndroms, das durch ein erhöhtes Krebsrisiko und schnelles Altern charakterisiert ist. Der bei 2 Patienten (WZ1, WZ4) gefundene SNP P868L ist mit einer häufigeren Entstehung von Schwesterchromatid-Veränderungen, langsamen Reaktionen auf DNA-Schädigung, sowie einer gestörten DSBs-Reparatur verbunden. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Änderung der Flexibilität und Hydrophilie (Leucin wirkt hydrophob) des Proteins. Dadurch wird die Bindung von dsDNA schwächer (100).

BRCA2 ist ein wichtiger Teil der HR-Reparatur, es bindet RAD51 und ermöglicht eine ssDNA-RAD51 Interaktion. Überdies ist das Protein möglicherweise bei einer Aktivierung des S-Phase Checkpoints beteiligt. Es reguliert eine Zentrosomen-Duplikation und ist für die Vorbeugung der mit der Entstehung von R-Loops verbundenen DNA-Schädigungen und somit für das Aufrechterhalten der genomischen Stabilität erforderlich. BRCA2 Keimbahnmutationen sind, ähnlich wie bei BRCA1, mit einem erblichen Mamma- und Ovarialkarzinom verbunden. Die BRCA2-Aberrationen wurden durch Woollard bei 14% der SéSy-Patienten gefunden (78). In der Analyse von Hill et al. sowie Wang et al. wurde das Risiko von Non-Hodgkin-Lymphomen/diffus großzelligem Lymphom und follikulärem Lymphom in Bezug auf SNVs untersucht. Es wurde dahingehend kein Zusammenhang in diesen Arbeiten gefundenen, jedoch wurden die beiden SNPs, die wir in unserer Arbeit nachweisen konnten (N289H, N991D), nicht untersucht (96, 101). Laut NCBI wurde die klinische Bedeutung von oben genannten SNPs als „benign“ eingeschätzt. In der PROVEAN-Analyse haben diese 2 SNPs einen neutralen Effekt auf die Proteinfunktion, wobei laut der SIFT-Analyse die Aminosäure-Veränderung N289H schädlich/deletär sein sollte. Da die SNPs bei nur einem Patienten gefunden wurden (WZ8), ist keine relevante Bedeutung dieser SNPs für die Entstehung des SéSy anzunehmen.

IGHMBP2 kodiert eine Helikase und funktioniert als Transkriptionsregulator. Der bei 5 Patienten (WZ1, 23, 184, 223, 33) gefundene SNP T879K gilt laut NCBI als gutartig und wird bis jetzt nur mit dem Charcot-Marie-Tooth-Syndrom (neurale Muskelatrophie) in der koreanischen Population assoziiert (102).

Durch Ligase IV im Komplex mit XRCC4 erfolgt die Ligation von DNA-Endungen im letzten Schritt von NHEJ. Daher können Veränderungen im LIG4-Gen zur genomischen Instabilität und damit zur Tumorgenese führen. Der bei 2 Patienten (223, 333) gefundene nicht-synonyme SNP führt zum Aminosäuretausch T9I an der N-Endung des Proteins. Es wurde nachgewiesen, dass diese Struktur Veränderungen in der Kombination mit A3V zur

50%-igen Reduktion der Adenylierung und der Ligations-Aktivität führt (103, 104). Es wird allerdings auch das Vorhandensein von R278H als ausschlaggebender Faktor für diese Aktivitätsminderung diskutiert (105). Xie et al. konnten in ihrer Metaanalyse zeigen, dass der T9I-SNP mit erniedrigtem Krebsrisiko in der kaukasischen Population verbunden ist (106). Überdies wird er ebenso mit einem erniedrigten Risiko für Plattenepithelkarzinome des Kopfs/Halses, Non-Hodgkin Lymphome und multiples Myelom assoziiert (96, 107).

PALB2 spielt eine wesentliche Rolle bei HR, es aktiviert die Bindung von BRCA2 und RAD51 an DNA-Bruchstellen. Des Weiteren funktioniert es als „Gerüst“ für einen BRCA1-PALB2-BRCA2-Komplex und bindet BRCA2, sodass eine gewisse Konzentration vom Letzteren im Nukleus vorhanden ist. Keimbahnmutationen von PALB2 prädisponieren zu Mamma-, Ovarial-, Pankreaskarzinom, Fanconi-Anämie sowie malignem Melanom (108). Die bei nur einem Patienten (333) gefundene Variation Q559R (SIFT: „neutral“) wurde bei australischen Patientinnen mit familiärem Mammakarzinom gehäuft beobachtet (109).

RAD23B ist ein Teil des XPC/RAD23B/CETN2-Komplexes, der bei GG-NER DNA-Läsionen erkennt. Es stabilisiert und schützt vor einer Degradation XPC, überdies ist es bei der proteasomalen Degradation beteiligt. Die bei 2 Patienten (WZ1, 333) gefundene Variation A249V ist bekannt. In der Arbeit von Hill et al. konnte keine Assoziation dieses SNPs mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Non-Hodgkin Lymphomen gezeigt werden (96).

XPG (ERCC5) ist bei der Nukleotid-Exzision von NER beteiligt. Weiterhin funktioniert es als ein Cofaktor der DNA-Glycosylase, die oxydierte Pyrimidine aus der DNA entfernt. Der bei 3 Patienten (WZ1, WZ8, 333) gefundene nicht-synonyme Polymorphismus (D1558H) ist als Risikofaktor für Lungen-, Harnblase- und Uteruskarzinom, Akustikusneurinom sowie Mammakarzinom nach Bestrahlung-Exposition bekannt (110, 111).

XRCC1 funktioniert, dank der Fähigkeit Dimere und Oligomere zu bilden, als ein „Gerüst“ bei BER und DNA-Einzelstrangreparatur. Es interagiert mit verschiedenen Proteinen inklusive DNA-Glykosylasen, APE1, POL β , LIGIII α , PCNA, PARP1/2, PBKP und TDP1. Ein Mangel an XRCC1 führt zu erhöhter Sensitivität auf alkylierende Wirkstoffe, X- und UV-Bestrahlung, sowie zu einem gesteigerten Schwesterchromatidaustausch in den Zellmodellen. Die 3 häufigsten Varianten des XRCC1: R194W, R280H und R399Q wurden in zahlreichen Studien bezüglich des Krebsrisikos untersucht. Sie befinden sich in einer Region, die für die Rekrutierung von XRCC1 und Proteinen, mit denen es interagiert, wesentlich ist. Der bei 3 Patienten (WZ1, 23, 333) gefundene SNP R194W erhöht bei Homozygoten in der asiatischen

Population das Lungenkarzinomsrisiko, allerdings ist das Lungenkarzinomsrisiko bei Heterozygoten in der kaukasischen Population erniedrigt (112). Des Weiteren ist dieser SNP mit einem erniedrigten Risiko für Glioblastoma, Non-Hodgkin Lymphomen (unabhängig vom Typ) und einem erhöhten Risiko für Plattenepithelkarzinom, möglicherweise Zervix- und Schilddrüsenkarzinom verbunden. Die andere, bei 2 Patienten (WZ8, WZ9) gefundene Variante R280H, prädisponiert zum Mammakarzinom bei Frauen asiatischer, aber nicht kaukasischer Herkunft und ähnlich wie R194W zum Schilddrüsenkarzinom. R280H wird häufiger in Asien und seltener in Europa beobachtet. Außerdem wird es mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines malignen Melanoms assoziiert (112-115). Der Polymorphismus R194W ist im Gegensatz zu R280H mit einem verminderten Krebsrisiko verbunden (107). Eine Expression von R280H induziert sowohl eine genomische Instabilität durch die Akkumulation von DSBs, als auch eine Transformation bei humanen Epithelzellen. Dieser SNP kann möglicherweise zu fehlender oder gestörter Phosphorylierung von XRCC1 führen, was wiederum zur mangelhaften Aktivierung von anderen BER-Proteinen führt (116).

XRCC2 ist ein Teil des RAD21-Paralog Proteinkomplexes BCDX2, der bei HR beteiligt ist. BCDX2 aktiviert nach einer DNA-Schädigung BRCA2 und RAD51. Bei Zellen mit Mangel an XRCC2 ist die HR-Aktivität etwa 100x reduziert, wodurch die chromosomale Instabilität steigt. Bei der Reparatur von DNA-Schädigungen, die durch eine Strahlen- und Chemotherapie verursacht werden, ist XRCC2 erforderlich. Der Polymorphismus R188H wurde bei 4 Patienten (WZ1, WZ8, WZ9, 223) identifiziert. Seine Korrelation mit Non-Hodgkin Lymphomen konnte nicht festgestellt werden (96). Er wird allerdings mit erhöhtem Risiko für Mammakarzinome bei Heterozygoten (inklusive schlechteres Gesamtüberleben) und Ovarialkarzinome bei Homozygoten assoziiert, wobei die vorliegenden Studien-Ergebnisse nicht einstimmig sind (117-120). Weiterhin steht dieser SNP mit schlechterem Gesamtüberleben bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms in Zusammenhang (121,122).

6.2 Auswirkung von SNV auf Proteinfunktion

Die Suche nach einem Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen und einem bestimmten Phänotyp ist weiterhin eine Herausforderung. 81% bis 93% von humanen Genen verfügen über zumindest einen SNV. Bei jedem Mensch können bis 11 000 von non-synonymen und 50-100 Krankheit-assoziierten Variationen gefunden werden. 85% Erkrankungen mit einem genetischen Hintergrund werden mit nsSNVs verbunden. Diese Variationen können Proteinfaltung, Bindungsaffinität, Expression und posttranslazionale

Modifikation beeinflussen. Deletäre nsSNVs destabilisieren vor allem die Proteinfaltung. Ein Einfluss von diesen auf eine Proteinfunktion kann mittels verschiedenen Vorhersagemodellen geprüft werden. Zu diesen gehört PROVEAN, welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Diese Analysesoftware ermöglicht anhand der Sequenz und Struktur von homologen Proteinen sowie in Abhängigkeit von Nachbar-Aminosäuren eine Vorhersage, ob eine Variation inklusive Deletionen und Insertionen einen deletären oder neutralen Einfluss auf die Proteinfunktion hat (123-125). Überdies sind die Ergebnisse von diesem Algorithmus mit den Ergebnissen anderer Analysesoftware (z. B. SIFT) vergleichbar. PROVEAN ist allerdings nicht fehlerfrei; die Sensitivität beträgt 78,39% (123).

Eine Analyse mittels PROVEAN wurde nur bei bislang nicht bekannten SNVs durchgeführt, da bei bekannten SNPs die Auswirkungen auf die Proteinfunktion bereits beschrieben sind, beziehungsweise Daten zu klinischer Bedeutung von SNPs vorliegen. Bei Genen AKT1, NEIL1, POLA1, POLD1/2, PRKDC, RTEL1 und TP53 wurde ein deletärer Effekt festgestellt, wobei diese SNVs bei jeweils nur einem Patienten (bei 5 Genen war das WZ1) nachgewiesen werden konnten. Daher ist eine generelle Bedeutung dieser SNVs für die Pathogenese des SéSy nicht anzunehmen. Laut SIFT wurden 3 SNVs in den oben genannten Genen (POLD1: M255L und M612I, RTEL1: S28Y) als „neutral“ eingeschätzt. Ein Zusammenhang von nsSNVs mit deletärem Effekt und einem DNA-Reparaturweg konnte nicht gefunden werden. Bei einigen nsSNVs konnte der Einfluss auf Proteinfunktion nicht festgestellt werden, was möglicherweise durch fehlende homologe Proteinsequenz erklärt werden kann.

Die nsSNVs, die sich nicht in einer kodierenden Sequenz des Gens befinden, können eine Chromatin-Zugänglichkeit, Spleißstellen und epigenetische Modifikation beeinflussen (124). Bei erneuter Analyse von Genen, konnten jeweils 7 nsSNVs bei 2 Genen: N4BP2 (beteiligt an MMR) und POLK (beteiligt an NER) gefunden werden. Bei anderen Genen (APLF, BCL2, BRCA1, BRCA2, POLA1, POLD2, RAD52, TOP3A, XPF) wurden max. 3 nsSNVs identifiziert. Unter diesen Genen waren am häufigsten Gene der HR betroffen, was in Zusammenhang damit steht, dass die meisten SNVs bei Genen von diesem Weg gefunden wurden.

6.3 Nukleotid-Veränderungen

Die häufigste Nukleotid-Veränderung war mit 25% G→A. C→T lag mit 16% an der dritten Stelle in Bezug auf die Häufigkeit. Die beiden wurden als häufigste Nukleotid-Veränderungen in der Arbeit von Woollard et al. identifiziert, was ebenso bei anderen Krebserkrankungen gefunden wurde. In der oben zitierten Arbeit traten die Veränderungen C→T vor allem an den NpCpG Stellen auf, die mit der altersassoziierten Deaminierung an methylierten CpG-Stellen zusammenhängt. Die UV-bedingten CC→TT Veränderungen wurden bei Mycosis fungoides beschrieben, aber selten bei Sézary nachgewiesen, was durch eine unterschiedliche Herkunft der transformierten T-Zelle erklärt werden könnte. Dies unterstützt wiederum die Behauptung, dass Sézary-Zellen aus den „central-memory“ T-Zellen entstehen und steht in Widerspruch mit den Ergebnissen von Wang et al. (77, 78). In der Arbeit von Woollard et al. wurden alle SNVs inklusive stiller Veränderungen in Betracht gezogen, was ggf. eine niedrigere Anzahl von gefundenen Nukleotid-Veränderungen G→A und C→T (41% vs 61%) in der vorliegenden Arbeit erklärt.

6.4 Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Patienten

Die Mehrheit von gefundenen SNVs waren bei allen Patienten Missense-Veränderungen, bekannte und a. e. heterozygote SNVs. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde zwischen Patienten in Bezug auf bekannte/unbekannte und homozygote/heterozygote SNVs gefunden. Beim Patienten 23 wurden häufiger homozygote SNVs im Vergleich zu 223, WZ1 und WZ8 festgestellt. Genaue klinische Daten von untersuchten holländischen Patienten (Geschlecht, Alter, Krankheitsgeschichte) waren leider nicht komplett zu eruieren, somit dieser Unterschied nicht erklärt werden kann. In der Arbeit von Woollard et al. war auch die Mehrheit von SNVs nicht-synonym, am seltensten traten Nonsense-Variationen auf. Ein Zusammenhang von genetischen Veränderungen mit dem Gesamtüberleben konnte nicht festgestellt werden (78).

6.5 Häufigkeit von betroffenen DNA-Reparaturwegen

Die SNVs betrafen vor allem Gene der homologen Rekombination (47%). Dies entspricht den Ergebnissen von Woollard et al. (78). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Häufigkeit der betroffenen Genen bei Reparaturwegen festgestellt werden, was am ehesten auf die sehr geringe Patientenzahl zurückzuführen sein dürfte. In der oben zitierten Arbeit wurden Veränderung gehäuft bei RAD51C, POLD1, BRCA2 und TP53 beobachtet, die hier selten gefunden wurden. Auch dies

hängt a. e. mit einer deutlich geringeren Anzahl von Patienten (101 vs 8) in unserer Studie zusammen. Ähnlich wie in der Arbeit bei Woollard et al. waren Gene von NHEJ am zweithäufigsten betroffen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SNVs vor allem bei Genen, die an DSB-Reparatur (HR, NHEJ, MMEJ) beteiligt sind, auftraten. Da HR bei der Reaktivierung von Replikationsgabel an DSB-Stellen beteiligt ist, spielt dieser Mechanismus eine wesentliche Rolle bei der genomischen Stabilität. Fehler bei Replikation, die durch Blockieren oder Verlangsamung des Replikationsgabel-Progresses entstehen, führen zu Chromosomenbrüchen und Änderungen der genomischen Anordnung. Überdies kommt es zu Störungen der Mitose, was im Endeffekt die genomische Instabilität verstärkt (48).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die SNVs vor allem die Gene der DNA-Reparatur im Vergleich zu Genen, die an einer Zellzyklus-Kontrolle oder epigenetischen Regulation beteiligt sind, betreffen. Eine Folge von diesen Veränderungen ist eine genomische Instabilität, die ein charakteristisches Merkmal von SéSy darstellt. Unter den betroffenen Genen traten die Veränderungen vor allem bei BRCA1, CSB, EXO1, WRN und XRCC6BP1 auf, die bis jetzt nicht in Zusammenhang mit SéSy beschrieben wurden. Die Veränderungen der DNA-Reparaturwege sind allerdings wahrscheinlich nur ein Teil von verschiedenen Mechanismen, deren Störungen zu einer malignen Entartung einer T-Zelle führt. Überdies scheint die Patienten-Gruppe heterogen zu sein. Eine genaue Differenzierung der Patienten anhand der genetischen Veränderungen und somit betroffenen Signalwege kann zukünftig bei der Wahl der besten Therapie hilfreich sein (z. B. PARP-Inhibitoren bei Defekt der DSB-Reparatur).

Zusammenfassung

Sézary Syndrom ist ein seltenes kutanes Lymphom, das durch eine Erythrodermie und leukämische Ausschwemmung von malignen T-Zellen gekennzeichnet ist. Die Pathogenese dieser Erkrankung bleibt trotz zahlreicher Studien unklar. Bis jetzt wurden keine spezifischen Mutationen beschrieben. Es wird vermutet, dass Genveränderungen von verschiedenen Mechanismen im Endeffekt zur malignen T-Zell-Transformation und damit Entwicklung der Erkrankung führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Genome von 8 an Sézary Syndrom erkrankten Patienten auf Einzelnukleotid-Variationen (SNVs) bei 130 Genen, die vor allem an DNA-Reparaturmechanismen, des Weiteren Zellzyklus-Kontrolle und epigenetische Regulation beteiligt sind, untersucht. SNVs wurden bei 44 Genen (33,8%) gefunden. Die Mehrheit von diesen waren bekannte (62,8%), Missense- (97,7%) und a. e. heterozygote (86,3%) Variationen. Zwischen den Patienten bestand ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf bekannte/unbekannte sowie homozygote/heterozygote SNVs. Bei BRCA1, PRKDC, RTEL1 wurden jeweils 6 (maximale Anzahl) SNVs pro Gen festgestellt. Bei 6 von 8 (75%) Patienten wurden die Veränderungen bei BRCA1, CSB, EXO1, WRN und XRCC6BP1 gefunden. Am häufigsten waren Gene der homologen Rekombination (47%) betroffen. Ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die Häufigkeit von betroffenen DNA-Reparaturwegen bestand allerdings nicht. Am häufigsten traten jedoch SNVs bei Genen, die in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen involviert sind, auf. Dazu gehört außer der homologen Rekombination non-homologous und microhomology-mediated end joining (NHEJ, MMEJ). Diese Mechanismen spielen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität, deren Störung das charakteristische molekulare Merkmal des Sézary Syndroms darstellt. Eine genaue Differenzierung der Patienten anhand der genetischen Veränderungen und somit betroffenen Signalwegen kann zukünftig bei der Wahl der besten Therapie hilfreich sein.

Literaturverzeichnis

1. Sawicki W: *Histologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2003, 80-92.
2. Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA: *Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints*. *Annu Rev Genet.* 2002; 36: 617-56.
3. Helton ES, Chen X: *p53 modulation of the DNA damage response*. *J Cell Biochem.* 2007 Mar 1; 100(4): 883-96.
4. Giono LE, Manfredi JJ: *The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints*. *J Cell Physiol.* 2006 Oct; 209(1): 13-20.
5. Baran K, Yang M, Dillon CP, Samson LL, Green DR: *The proline rich domain of p53 is dispensable for MGMT-dependent DNA repair and cell survival following alkylation damage*. *Cell Death Differ.* 2017 Nov; 24(11): 1925-1936.
6. Carr MI, Jones SN: *Regulation of the Mdm2-p53 signaling axis in the DNA damage response and tumorigenesis*. *Transl Cancer Res.* 2016 Dec; 5(6): 707-724.
7. Wadhwa R, Kalra RS, Kaul SC: *CARF is a multi-module regulator of cell proliferation and a molecular bridge between cellular senescence and carcinogenesis*. *Mech Ageing Dev.* 2017 Sep; 166: 64-68.
8. Drané P, Brault ME, Cui G, Meghani K, Chaubey S, Detappe A, Parnandi N, He Y, Zheng XF, Botuyan MV, Kalousi A, Yewdell WT, Münch C, Harper JW, Chaudhuri J, Soutoglou E, Mer G, Chowdhury D: *TIRR regulates 53BP1 by masking its histone methyl-lysine binding function*. *Nature.* 2017 Mar 9; 543(7644): 211-216. Abstract.
9. Zhang A, Peng B, Huang P, Chen J, Gong Z: *The p53-binding protein 1-Tudor-interacting repair regulator complex participates in the DNA damage response*. *J Biol Chem.* 2017 Apr 21; 292(16): 6461-6467. Abstract.
10. Barnum KJ, O'Connell MJ: *Cell cycle regulation by checkpoints*. *Methods Mol Biol.* 2014; 1170: 29-40.
11. Garinis GA, van der Horst GT, Vijg J, Hoeijmakers JH: *DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem*. *Nat Cell Biol.* 2008 Nov; 10(11): 1241-1247.
12. Matthews LA, Cabarcas SM, Hurt EM: *DNA Repair of Cancer Stem Cells*, Chapter 2, Springer Science 2013, 19-32.
13. Bhatia N, Berman B, Ceilleury RI, Kircik LH: *Understanding the Role of Photolyases: Photoprotection and Beyond*. *J Drugs Dermatol.* 2017 May 1;16(5): 61-66.
14. Chatterjee N, Walker GC: *Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis*. *Environ Mol Mutagen.* 2017 Jun; 58(5): 235-263.

15. Schneider S, Görig T, Schilling L, Breitbart EW, Greinert R, Diehl K: *German "National Cancer Aid Monitoring" 2015-2019-study protocol and initial results.* J Dtsch Dermatol Ges. 2017 Sep; 15(9): 895-903. Abstract.
16. Deans AJ, West SC: *DNA interstrand crosslink repair and cancer.* Nat Rev Cancer. 2011 Jun 24; 11(7): 467-480.
17. Stadler J, Richly H: *Regulation of DNA Repair Mechanisms: How the Chromatin Environment Regulates the DNA Damage Response.* Int J Mol Sci. 2017 Aug 5; 18(8): 1715.
18. Wallace SS: *Base excision repair: a critical player in many games.* DNA Repair (Amst). 2014 Jul; 19: 14-26.
19. Prakash A, Doublé S: *Base Excision Repair in the Mitochondria.* J Cell Biochem. 2015 Aug; 116(8): 1490-1499.
20. Prasad R, Beard WA, Batra VK, Liu Y, Shock DD, Wilson SH: *A review of recent experiments on step-to-step "hand-off" of the DNA intermediates in mammalian base excision repair pathways.* Mol Biol (Mosk). 2011 Jul-Aug; 45(4): 586-600.
21. Sadeghian K, Ochsenfeld C: *Unraveling the Base Excision Repair Mechanism of Human DNA Glycosylase.* J Am Chem Soc. 2015 Aug 12; 137(31): 9824-9831. Abstract.
22. Hinz JM, Czaja W: *Facilitation of base excision repair by chromatin remodeling.* DNA Repair (Amst). 2015 Dec; 36: 91-97.
23. Melis J, van Steeg H, Luijten M: *Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair.* Antioxid Redox Signal. 2013 Jun 20; 18(18): 2409–2419.
24. Schärer O: *Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Oct; 5(10): a012609.
25. Fagbemi A, Orelli B, Schärer O: *Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair.* DNA Repair (Amst) 2011 July 15; 10(7): 722-729.
26. Spivak G: *Nucleotide excision repair in humans.* DNA Repair (Amst). 2015 December; 36: 13–18.
27. Brooks PJ: *Blinded by the UV light: How the focus on transcription-coupled NER has distracted from understanding the mechanisms of Cockayne syndrome neurologic disease.* DNA Repair (Amst). 2013 Aug; 12(8): 656–671.
28. Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, DiGiovanna JJ: *Xeroderma pigmentosum, Trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship.* Neuroscience. 2007 Apr 14; 145(4): 1388–1396.

29. Diderich K, Alanazi M, Hoeijmakers JHJ: *Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders*. DNA Repair (Amst). 2011 Jul 15; 10(7): 772–780.
30. Kjølhede Jeppesen D, Bohr VA, Stevnsner T: *DNA Repair Deficiency in Neurodegeneration*. Prog Neurobiol. 2011 Jul; 94(2): 166–200. Abstract.
31. Fishel R: *Mismatch repair*. J Biol Chem. 2015 Oct 30; 290(44): 26395-26403.
32. Hinrichsen I, Weßbecher IM, Huhn M, Passmann S, Zeuzem S, Plotz G, Biondi RM, Brieger A: *Phosphorylation-dependent signaling controls degradation of DNA mismatch repair protein PMS2*. Mol Carcinog. 2017 Dec; 56(12): 2663-2668.
33. Sijmons RH, Hofstra RM: *Review: Clinical aspects of hereditary DNA Mismatch repair gene mutations*. DNA Repair (Amst). 2016 Feb; 38: 155-1562.
34. Ryan NAJ, Morris J, Green K, Lalloo F, Woodward ER, Hill J, Crosbie EJ, Evans DG: *Association of Mismatch Repair Mutation With Age at Cancer Onset in Lynch Syndrome: Implications for Stratified Surveillance Strategies*. JAMA Oncol. 2017 Dec 1; 3(12): 1702-1706.
35. Ryan E, Sheahan K, Creavin B, Mohan HM, Winter DC: *The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing*. Crit Rev Oncol Hematol. 2017 Aug; 116: 38-57.
36. Guedes L, Antonarakis ES, Schweizer MT, Mirkheshti N, Almutairi F, Park JC, Glavaris SA, Hicks JL, Eisenberger MA, De Marzo AM, Epstein JI, Isaacs WB, Eshleman JR, Pritchard CC, Lotan TL: *MSH2 Loss in Primary Prostate Cancer*. Clin Cancer Res. 2017 Nov 15; 23(22): 6863-6874. Abstract.
37. Erie DA, Weninger KR: *Single molecule Studies of DNA Mismatch Repair*. DNA Repair (Amst). 2014 Aug; 20: 71–81.
38. Yilun L: *EEPD1: Breaking and Rescuing the Replication Fork*. PLoS Genet. 2016 Feb; 12(2): e1005742.
39. Nickoloff JA: *Paths from DNA damage and signaling to genome rearrangements via homologous recombination*. Mutat Res. 2017 Dec; 806: 64-74.
40. Shibata A: *Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks*. Mutat Res. 2017 Oct; 803-805: 51-55.
41. Grabarz A, Barascu A, Guirouilh-Barbat J, Lopez BS: *Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining*. Am J Cancer Res. 2012; 2(3): 249-268.

42. Sengupta S, Harris CC: *p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Jan; 6(1): 44-55.
43. Tan-Wong SM, Proudfoot NJ: *Rad51, friend or foe?* Elife. 2013 Jun 11; 2: e00914.
44. Karpenshif Y, Bernstein KA: *From yeast to mammals: recent advances in genetic control of homologous recombination*. DNA Repair (Amst). 2012 Oct 1; 11(10): 781-788.
45. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M: *Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 Apr 1; 7(4): a016600.
46. Buisson R, Dion-Côté AM, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, Stasiak A, Xia B, Masson JY: *Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination*. Nat Struct Mol Biol. 2010 Oct; 17(10): 1247-1254.
47. Neff NF, Ellis NA, Ye TZ, Noonan J, Huang K, Sanz M, Proytcheva M: *The DNA Helicase Activity of BLM Is Necessary for the Correction of the Genomic Instability of Bloom Syndrome Cells*. Mol Biol Cell. 1999 Mar; 10(3): 665-676.
48. Guirouilh-Barbat J, Lambert S, Bertrand P, Lopez BS: *Is homologous recombination really an error-free process?* Front Genet. 2014; 5: 175.
49. Valka J, Vesela J, Votavova H, Dostalova-Merkerova M, Horakova Z, Campr V, Brezinova J, Zemanova Z, Jonasova A, Cermak J, Belickova M: *Differential expression of homologous recombination DNA repair genes in the early and advanced stages of myelodysplastic syndrome*. Eur J Haematol. 2017 Oct; 99(4): 323-331. Abstract.
50. Aceytuno RD, Pieltz CG, Havali-Shahriari Z, Edwards RA, Rey M, Ye R, Javed F, Fang S, Mani R, Weinfeld M, Hammel M, Tainer JA, Schriemer DC, Lees-Miller SP, Glover JNM: *Structural and functional characterization of the PNKP-XRCC4-LigIV DNA repair complex*. Nucleic Acids Res. 2017 Jun 2; 45(10): 6238-6251.
51. Löbrich M, Jeggo P: *A Process of Resection-Dependent Nonhomologous End Joining Involving the Goddess Artemis*. Trends Biochem Sci. 2017 Sep; 42(9): 690-701.
52. Seol JH, Shim EY, Lee SE: *Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly*. Mutat Res. 2018 May; 809: 81-87.
53. Sorenson KS, Mahaney BL, Lees-Miller SP, Cobb JA: *The non-homologous end-joining factor Nej1 inhibits resection mediated by Dna2-Sgs1 nuclease-helicase at DNA double strand breaks*. J Biol Chem. 2017 Sep 1; 292(35): 14576-14586.

54. Gassman NR, Stefanick DF, Kedar PS, Horton JK, Wilson SH: *Hyperactivation of PARP triggers nonhomologous end-joining in repair-deficient mouse fibroblasts*. PLoS One. 2012; 7(11): e49301.
55. González-Marín C, Gosálvez J, Roy R: *Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells*. Int J Mol Sci. 2012 Oct 31; 13(11): 14026-52.
56. www.uptodate.com
57. Pawlaczyk M, Filas V, Sobieska M, Gozdzicka-Józefiak A, Wiktorowicz K, Breborowicz J: *No evidence of HTLV-I infection in patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome*. Neoplasma. 2005; 52(1): 52-5. Abstract.
58. Wong HK, Mishra A, Hake T, Porcu P: *Evolving insights in the pathogenesis and therapy of cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome)*. Br J Haematol. 2011 Oct; 155(2): 150-66.
59. Trautinger F, Eder J, Assaf C, Bagot M, Cozzio A, Dummer R, Gniadecki R, Klemke CD, Ortiz-Romero PL, Papadavid E, Pimpinelli N, Quaglino P, Ranki A, Scarisbrick J, Stadler R, Väkevä L, Vermeer MH, Whittaker S, Willemze R, Knobler R: *European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome-Update 2017*. Eur J Cancer. 2017 May; 77: 57-74.
60. Bernengo MG, Quaglino P, Novelli M, Cappello N, Doveil GC, Lisa F, De Matteis A, Fierro MT, Appino A: *Prognostic factors in Sézary syndrome: a multivariate analysis of clinical, haematological and immunological features*. Ann Oncol. 1998 Aug; 9(8): 857-63.
61. Scarisbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P, Horwitz S, Porcu P, Stadler R, Wood GS, Beylot-Barry M, Pham-Ledard A, Foss F, Girardi M, Bagot M, Michel L, Battistella M, Guitart J, Kuzel TM, Martinez-Escala ME, Estrach T, Papadavid E, Antoniou C, Rigopoulos D, Nikolaou V, Sugaya M, Miyagaki T, Gniadecki R, Sanches JA, Cury-Martins J, Miyashiro D, Servitje O, Muniesa C, Berti E, Onida F, Corti L, Hodak E, Amitay-Laish I, Ortiz-Romero PL, Rodríguez-Peralto JL, Knobler R, Porkert S, Bauer W, Pimpinelli N, Grandi V, Cowan R, Rook A, Kim E, Pileri A, Patrizi A, Pujol RM, Wong H, Tyler K, Stranzenbach R, Querfeld C, Fava P, Maule M, Willemze R, Evison F, Morris S, Twigger R, Talpur R, Kim J, Ognibene G, Li S, Tavallae M, Hoppe RT, Duvic M, Whittaker SJ, Kim YH: *Cutaneous Lymphoma International Consortium Study of Outcome in Advanced Stages of Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Effect of Specific Prognostic Markers on*

- Survival and Development of a Prognostic Model.* J Clin Oncol. 2015 Nov 10; 33(32): 3766-73.
62. Lebowitz E, Geller S, Flores E, Pulitzer M, Horwitz S, Moskowitz A, Kheterpal M, Myskowski PL: *Survival, disease progression and prognostic factors in elderly patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome: a retrospective analysis of 174 patients.* J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019 Jan; 33(1): 108-114.
 63. Alberti-Violetti S, Talpur R, Schlichte M, Sui D, Duvic M: *Advanced-stage mycosis fungoides and Sézary syndrome: survival and response to treatment.* Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2015 Jun; 15(6): e105-12.
 64. Benton EC, Crichton S, Talpur R, Agar NS, Fields PA, Wedgeworth E, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, Liu P, Robson A, Calonje E, Stefanato CM, Wilkins B, Scarisbrick J, Wain EM, Child F, Morris S, Duvic M, Whittaker SJ: *A cutaneous lymphoma international prognostic index (CLIPi) for mycosis fungoides and Sezary syndrome.* Eur J Cancer. 2013 Sep; 49(13): 2859-68.
 65. Danish HH, Liu S, Jhaveri J, Flowers CR, Lechowicz MJ, Esiashvili N, Khan MK: *Validation of cutaneous lymphoma international prognostic index (CLIPi) for mycosis fungoides and Sézary syndrome.* Leuk Lymphoma. 2016 Dec; 57(12): 2813-19.
 66. Olsen EA, Hodak E, Anderson T, Carter JB, Henderson M, Cooper K, Lim HW: *Guidelines for phototherapy of mycosis fungoides and Sézary syndrome: A consensus statement of the United States Cutaneous Lymphoma Consortium.* J Am Acad Dermatol. 2016 Jan; 74(1): 27-58.
 67. Willemze R, Hodak E, Zinzani PL, Specht L, Ladetto M: *Primary cutaneous lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* Annals of Oncology 24 (Supplement 6): vi149-vi154, 2013.
 68. Welborn M, Duvic M: *Antibody-Based Therapies for Cutaneous T-Cell Lymphoma.* Am J Clin Dermatol. 2019 Feb; 20(1): 115-122.
 69. Bonnet P, Battistella M, Roelens M, Ram-Wolff C, Herms F, Frumholtz L, Bouaziz JD, Brice P, Moins-Teisserenc H, Bagot M, de Masson A: *Association of autoimmunity and long-term complete remission in patients with Sézary syndrome treated with mogamulizumab.* Br J Dermatol. 2019 Feb; 180(2): 419-420.
 70. Nanni L, Morigi A, Casadei B, Broccoli A, Stefoni V, Argnani L, Cavo M, Zinzani PL: *A case report of the long treatment experience of a Sézary syndrome responder patient: 16 years through all the systemic and innovative therapies.* Hematol Oncol. 2019 Apr; 37(2): 202-204.

71. Behle V, von Braunmühl T, Sayehli C, Gesierich A, Goebeler M, Geissinger E, Wobser M: *Sézary Syndrome with Nodal CD30-positive Manifestation Treated with Brentuximab Vedotin and Extracorporeal Photopheresis*. *Acta Derm Venereol*. 2017 Aug 31; 97(8): 973-75.
72. Atilla E, Atilla PA, Bozdag SC, Yuksel MK, Toprak SK, Topcuoglu P, Akay BN, Sanli H, Gurman G, Ozcan M: *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for refractory mycosis fungoides (MF) and Sezary syndrome (SS)*. *Int J Hematol*. 2017 Sep; 106(3): 426-430.
73. Lechowicz MJ, Lazarus HM, Carreras J, Laport GG, Cutler CS, Wiernik PH, Hale GA, Maharaj D, Gale RP, Rowlings PA, Freytes CO, Miller AM, Vose JM, Maziarz RT, Montoto S, Maloney DG, Hari PN: *Allogeneic hematopoietic cell transplantation for mycosis fungoides and Sezary syndrome*. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Nov; 49(11): 1360-5.
74. <https://openclipart.org/detail/95191/genetic-code>
75. Caprini E, Cristofolletti C, Arcelli D, Fadda P, Citterich MH, Sampogna F, Magrelli A, Censi F, Torreri P, Frontani M, Scala E, Picchio MC, Temperani P, Monopoli A, Lombardo GA, Taruscio D, Narducci MG, Russo G: *Identification of key regions and genes important in the pathogenesis of Sezary syndrome by combining genomic and expression microarrays*. *Cancer Res*. 2009 Nov 1; 69(21): 8438-46.
76. Mao X, Chaplin T, Young BD: *Integrated genomic analysis of Sézary syndrome*. *Genet Res Int*. 2011; 2011: 980150.
77. Wang L, Ni X, Covington KR, Yang BY, Shiu J, Zhang X, Xi L, Meng Q, Langridge T, Drummond J, Donehower LA, Doddapaneni H, Muzny DM, Gibbs RA, Wheeler DA, Duvic M: *Genomic profiling of Sézary syndrome identifies alterations of key T cell signaling and differentiation genes*. *Nat Genet*. 2015 Dec; 47(12): 1426-34.
78. Woollard WJ, Pullabhatla V, Lorenc A, Patel VM, Butler RM, Bayega A, Begum N, Bakr F, Dedhia K, Fisher J, Aguilar-Duran S, Flanagan C, Ghasemi AA, Hoffmann RM, Castillo-Mosquera N, Nuttall EA, Paul A, Roberts CA, Solomonidis EG, Tarrant R, Yoxall A, Beyers CZ, Ferreira S, Tosi I, Simpson MA, de Rinaldis E, Mitchell TJ, Whittaker SJ: *Candidate driver genes involved in genome maintenance and DNA repair in Sézary syndrome*. *Blood*. 2016 Jun 30; 127(26): 3387-97.

79. Prasad A, Rabionet R, Espinet B, Zapata L, Puiggros A, Melero C, Puig A, Sarria-Trujillo Y, Ossowski S, Garcia-Muret MP, Estrach T, Servitje O, Lopez-Lerma I, Gallardo F, Pujol RM, Estivill X: *Identification of Gene Mutations and Fusion Genes in Patients with Sézary Syndrome*. *J Invest Dermatol*. 2016 Jul; 136(7): 1490-1499.
80. Chevret E, Merlio JP: *Sézary Syndrome: Translating Genetic Diversity into Personalized Medicine*. *J Invest Dermatol*. 2016 Jul; 136(7): 1319-24.
81. Iżykowska K, Przybylski GK, Gand C, Braun FC, Grabarczyk P, Kuss AW, Olek-Hrab K, Bastidas Torres AN, Vermeer MH, Zoutman WH, Tensen CP, Schmidt CA: *Genetic rearrangements result in altered gene expression and novel fusion transcripts in Sézary syndrome*. *Oncotarget*. 2017 Jun 13; 8(24): 39627-39.
82. Cox DG, Simard J, Sinnott D, Hamdi Y, Soucy P, Ouimet M, Barjhoux L, Verny-Pierre C, McGuffog L, Healey S, Szabo C, Greene MH, Mai PL, Andrulis IL; Ontario Cancer Genetics Network, Thomassen M, Gerdes AM, Caligo MA, Friedman E, Laitman Y, Kaufman B, Paluch SS, Borg Å, Karlsson P, Askmalm MS, Bustinza GB; SWE-BRCA Collaborators, Nathanson KL, Domchek SM, Rebbeck TR, Benítez J, Hamann U, Rookus MA, van den Ouweland AM, Ausems MG, Aalfs CM, van Asperen CJ, Devilee P, Gille HJ; HEBON; EMBRACE, Peock S, Frost D, Evans DG, Eeles R, Izatt L, Adlard J, Paterson J, Eason J, Godwin AK, Remon MA, Moncoutier V, Gauthier-Villars M, Lasset C, Giraud S, Hardouin A, Berthet P, Sobol H, Eisinger F, Bressac de Paillerets B, Caron O, Delnatte C; GEMO Study Collaborators, Goldgar D, Miron A, Ozcelik H, Buys S, Southey MC, Terry MB; Breast Cancer Family Registry, Singer CF, Dressler AC, Tea MK, Hansen TV, Johannsson O, Piedmonte M, Rodriguez GC, Basil JB, Blank S, Toland AE, Montagna M, Isaacs C, Blanco I, Gayther SA, Moysich KB, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Engel C, Meindl A, Ditsch N, Arnold N, Niederacher D, Sutter C, Gadzicki D, Fiebig B, Caldes T, Laframboise R, Nevanlinna H, Chen X, Beesley J, Spurdle AB, Neuhausen SL, Ding YC, Couch FJ, Wang X, Peterlongo P, Manoukian S, Bernard L, Radice P, Easton DF, Chenevix-Trench G, Antoniou AC, Stoppa-Lyonnet D, Mazoyer S, Sinilnikova OM; Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. *Common variants of the BRCA1 wild-type allele modify the risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers*. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 1; 20(23): 4732-47.

83. Yang M, Du X, Zhang F, Yuan S: *Association between BRCA1 polymorphisms rs799917 and rs1799966 and breast cancer risk: a meta-analysis*. J Int Med Res. 2019 Apr; 47(4): 1409-16.
84. Lee SY, Kang HG, Yoo SS, Kang YR, Choi YY, Lee WK, Choi JE, Jeon HS, Shin KM, Oh IJ, Kim KS, Lee J, Cha SI, Kim CH, Kim YC, Park JY: *Polymorphisms in DNA repair and apoptosis-related genes and clinical outcomes of patients with non-small cell lung cancer treated with first-line paclitaxel-cisplatin chemotherapy*. Lung Cancer. 2013 Nov; 82(2): 330-9.
85. Zhu Y, Zhai K, Ke J, Li J, Gong Y, Yang Y, Tian J, Zhang Y, Zou D, Peng X, Gong J, Zhong R, Huang K, Chang J, Miao X: *BRCA1 missense polymorphisms are associated with poor prognosis of pancreatic cancer patients in a Chinese population*. Oncotarget. 2017 May 30; 8(22): 36033-39.
86. Xu GP, Zhao Q, Wang D, Xie WY, Zhang LJ, Zhou H, Chen SZ, Wu LF: *The association between BRCA1 gene polymorphism and cancer risk: a meta-analysis*. Oncotarget. 2018 Jan 6; 9(9): 8681-94.
87. Dong J, Zhang T, Ren Y, Wang Z, Ling CC, He F, Li GC, Wang C, Wen B: *Inhibiting DNA-PKcs in a non-homologous end-joining pathway in response to DNA double-strand breaks*. Oncotarget. 2017 Apr 4; 8(14): 22662-73.
88. Dong J, Ren Y, Zhang T, Wang Z, Ling CC, Li GC, He F, Wang C, Wen B: *Inactivation of DNA-PK by knockdown DNA-PKcs or NU7441 impairs non-homologous end-joining of radiation-induced double strand break repair*. Oncol Rep. 2018 Mar; 39(3): 912-20.
89. Uringa EJ, Youds JL, Lisaingo K, Lansdorp PM, Boulton SJ: *RTEL1: an essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination*. Nucleic Acids Res. 2011 Mar; 39(5): 1647-55.
90. Vannier JB, Sarek G, Boulton SJ: *RTEL1: functions of a disease-associated helicase*. Trends Cell Biol. 2014 Jul; 24(7): 416-25.
91. Wheless L, Kistner-Griffin E, Jorgensen TJ, Ruczinski I, Berthier-Schaad Y, Kessing B, Hoffman-Bolton J, Francis L, Shugart YY, Strickland PT, Kao WH, Alani RM, Smith MW, Alberg AJ: *A community-based study of nucleotide excision repair polymorphisms in relation to the risk of non-melanoma skin cancer*. J Invest Dermatol. 2012 May; 132(5): 1354-62.

92. Zanusso C, Bortolus R, Dreussi E, Polesel J, Montico M, Cecchin E, Gagno S, Rizzolio F, Arcicasa M, Novara G, Toffoli G: *Impact of DNA repair gene polymorphisms on the risk of biochemical recurrence after radiotherapy and overall survival in prostate cancer*. *Oncotarget*. 2017 Apr 4; 8(14): 22863-75. Abstract.
93. Zhang M, Zhao D, Yan C, Zhang L, Liang C: *Associations between Nine Polymorphisms in EXO1 and Cancer Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis of 39 Case-control Studies*. *Sci Rep* 2016; 6: 29270.
94. Song F, Qureshi AA, Zhang J, Amos CI, Lee JE, Wei Q, Han J: *Exonuclease 1 (EXO1) gene variation and melanoma risk*. *DNA Repair (Amst)*. 2012 Mar 1; 11(3): 304-9.
95. Shamanna RA, Lu H, de Freitas JK, Tian J, Croteau DL, Bohr VA: *WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining*. *Nat Commun*. 2016; 7: 13785.
96. Hill DA, Wang SS, Cerhan JR, Davis S, Cozen W, Severson RK, Hartge P, Wacholder S, Yeager M, Chanock SJ, Rothman N: *Risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes*. *Blood*. 2006 Nov 1; 108(9): 3161-7.
97. Lan Q, Zhang L, Shen M, Jo WJ, Vermeulen R, Li G, Vulpe C, Lim S, Ren X, Rappaport SM, Berndt SI, Yeager M, Yuenger J, Hayes RB, Linet M, Yin S, Chanock S, Smith MT, Rothman N: *Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between DNA repair and genomic maintenance and development of benzene hematotoxicity*. *Carcinogenesis*. 2009 Jan; 30(1): 50-8.
98. Fischer U, Rheinheimer S, Krempler A, Löbrich M, Meese E: *Glioma-amplified sequence KUB3 influences double-strand break repair after ionizing radiation*. *Int J Oncol*. 2013 Jul; 43(1): 50-6.
99. Erasmus H, Gobin M, Niclou S, Van Dyck E: *DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma*. *Mutation Research* 769 (2016); 19-35.
100. Shastri V, Schmidt K: *Cellular defects caused by hypomorphic variants of the Bloom syndrome helicase gene BLM*. *Mol Genet Genomic Med*. 2016 Jan; 4(1): 106-19.
101. Wang SS, Maurer MJ, Morton LM, Habermann TM, Davis S, Cozen W, Lynch CF, Severson RK, Rothman N, Chanock SJ, Hartge P, Cerhan JR: *Polymorphisms in DNA repair and one-carbon metabolism genes and overall survival in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma*. *Leukemia*. 2009 Mar; 23(3): 596-602.

102. Kim HJ, Hong YB, Park JM, Choi YR, Kim YJ, Yoon BR, Koo H, Yoo JH, Kim SB, Park M, Chung KW, Choi BO: *Mutations in the PLEKHG5 gene is relevant with autosomal recessive intermediate Charcot-Marie-Tooth disease*. Orphanet J Rare Dis. 2013 Jul 12; 8: 104.
103. Jiao K, Qin J, Zhao Y, Zhang H: *Genetic effects of XRCC4 and ligase IV genes on human glioma*. Neuroreport. 2016 Sep 28; 27(14): 1024-30. Abstract.
104. Girard PM, Kysela B, Härer CJ, Doherty AJ, Jeggo PA: *Analysis of DNA ligase IV mutations found in LIG4 syndrome patients: the impact of two linked polymorphisms*. Hum Mol Genet. 2004 Oct 15; 13(20): 2369-76.
105. Ahmed S: *Diseases of DNA Repair*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media LLC 2010; 182-3.
106. Xie S, Shan XF, Shang K, Xu H, He J, Cai ZG: *Relevance of LIG4 gene polymorphisms with cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis*. Sci Rep. 2014 Oct 15; 4: 6630.
107. Wang M, Chu H, Zhang Z, Wei Q: *Molecular epidemiology of DNA repair gene polymorphisms and head and neck cancer*. J Biomed Res. 2013 May; 27(3): 179-92.
108. Aoude LG, Xu M, Zhao ZZ, Kovacs M, Palmer JM, Johansson P, Symmons J, Trent JM, Martin NG, Montgomery GW, Brown KM, Hayward NK: *Assessment of PALB2 as a Candidate Melanoma Susceptibility Gene*. PLoS One. 2014; 9(6): e100683.
109. Teo ZL, Park DJ, Provenzano E, Chatfield CA, Odefrey FA, Nguyen-Dumont T; kConFab, Dowty JG, Hopper JL, Winship I, Goldgar DE, Southey MC: *Prevalence of PALB2 mutations in Australasian multiple-case breast cancer families*. Breast Cancer Res. 2013; 15(1): R17.
110. Joo J, Yoon KA, Hayashi T, Kong SY, Shin HJ, Park B, Kim YM, Hwang SH, Kim J, Shin A, Kim JY: *Nucleotide Excision Repair Gene ERCC2 and ERCC5 Variants Increase Risk of Uterine Cervical Cancer*. Cancer Res Treat. 2016 Apr; 48(2): 708-14.
111. Rajaraman P, Hutchinson A, Wichner S, Black PM, Fine HA, Loeffler JS, Selker RG, Shapiro WR, Rothman N, Linet MS, Inskip PD: *DNA repair gene polymorphisms and risk of adult meningioma, glioma, and acoustic neuroma*. Neuro-Oncol. 2010 Jan; 12(1): 37-48. Abstract.

112. Hanssen-Bauer A, Solvang-Garten K, Gilljam KM, Torseth K, Wilson DM, Akbari M, Otterlei M: *The region of XRCC1 which harbours the three most common nonsynonymous polymorphic variants, is essential for the scaffolding function of XRCC1*. DNA Repair (Amst). 2012 Apr 1; 11(4): 357-66.
113. Hanssen-Bauer A, Solvang-Garten K, Akbari M, Otterlei M: *X-ray repair cross complementing protein 1 in base excision repair*. Int J Mol Sci. 2012 Dec 17; 13(12): 17210-29.
114. Li Y, Liu F, Tan SQ, Wang Y, Li SW: *X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) genetic polymorphisms and cervical cancer risk: a huge systematic review and meta-analysis*. PLoS One. 2012; 7(9): e44441. Abstract.
115. Zhao JZ, Tan XR, Zhao M, Mao XC, Jiang L: *Association between the X-ray repair cross-complementing group 1 Arg194Trp polymorphism and thyroid carcinoma susceptibility: A meta-analysis*. Genet Mol Res. 2016 Aug 5; 15(3).
116. Sizova DV, Keh A, Taylor BF, Sweasy JB: *The R280H X-ray cross-complementing 1 germline variant induces genomic instability and cellular transformation*. DNA Repair (Amst). 2015 Jul; 31: 73-9.
117. Lin WY, Camp NJ, Cannon-Albright LA, Allen-Brady K, Balasubramanian S, Reed MW, Hopper JL, Apicella C, Giles GG, Southey MC, Milne RL, Arias-Pérez JI, Menéndez-Rodríguez P, Benítez J, Grundmann M, Dubrowinskaja N, Park-Simon TW, Dörk T, Garcia-Closas M, Figueroa J, Sherman M, Lissowska J, Easton DF, Dunning AM, Rajaraman P, Sigurdson AJ, Doody MM, Linet MS, Pharoah PD, Schmidt MK, Cox A: *A role for XRCC2 gene polymorphisms in breast cancer risk and survival*. J Med Genet. 2011 Jul; 48(7): 477-84.
118. Kamali M, Hamadani S, Neamatzadeh H, Mazaheri M, Zare Shehneh M, Modaress Gilani M, Haghighi F: *Association of XRCC2 rs3218536 Polymorphism with Susceptibility of Breast and Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Asian Pac J Cancer Prev. 2017 Jul 27; 18(7): 1743-49. Abstract.
119. Michalska MM, Samulak D, Romanowicz H, Jabłoński F, Smolarz B: *Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of XRCC2 and XRCC3 homologous recombination repair genes and ovarian cancer in Polish women*. Experimental Mol Pathol. 2016 Apr; 100(2): 243-7. Abstract.

120. Smolarz B, Makowska M, Samulak D, Michalska MM, Mojs E, Wilczak M, Romanowicz H: *Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of XRCC2 and XRCC3 homologous recombination repair genes and triple-negative breast cancer in Polish women*. Clin Exp Med. 2015 May;15(2): 151-7. Abstract.
121. Li L, Zhu T, Gao YF, Zheng W, Wang CJ, Xiao L, Huang MS, Yin JY, Zhou HH, Liu ZQ: *Targeting DNA Damage Response in the Radio(Chemo)therapy of Non-Small Cell Lung Cancer*. Int J Mol Sci. 2016 Jun; 17(6): 839.
122. Pérez LO, Crivaro A, Barbisan G, Poleri L, Golijow CD: XRCC2 R188H (rs3218536), XRCC3 T241M (rs861539) and R243H (rs77381814) single nucleotide polymorphisms in cervical cancer risk. Pathol Oncol Res. 2013 Jul; 19(3): 553-8.
123. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP: *Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels*. PLoS One. 2012; 7(10): e46688.
124. Katsonis P, Koire A, Wilson SJ, Hsu TK, Lua RC, Wilkins AD, Lichtarge O: *Single nucleotide variations: biological impact and theoretical interpretation*. Protein Sci. 2014 Dec; 23(12): 1650-66.
125. Wagih O, Galardini M, Busby BP, Memon D, Typas A, Beltrao P: *A resource of variant effect predictions of single nucleotide variants in model organisms*. Mol Syst Biol. 2018 Dec 20; 14(12): e8430.

Tabellenverzeichnis

1. Primersequenzen	S. 31
2. Lösungen und Puffer	S. 31
3. PCR-Protokoll	S. 36
4. PCR-Ansatz	S. 36
5. Liste von Genen, die auf SNVs durchsucht wurden	S. 39
6. Gefundene SNVs bei durchsuchten Genen	S. 46
7. Art der Veränderungen bei bekannten/unbekannten SNVs	S. 57
8. Gene mit gefundenen SNVs bei Patienten	S. 59
9. SNVs bei Patienten mit Anteilung: missense/nonsense, bekannt/unbekannt, homozygot/heterozygot	S. 60

Abbildungsverzeichnis

1. BER-Mechanismus	S. 13
2. NER-Mechanismus	S. 15
3. MMR-Mechanismus	S. 17
4. HR-Mechanismus	S. 20
5. NHEJ-Mechanismus	S. 23
6. Genetischer Code nach Maetthei und Nierenberg	S. 44
7. Darstellung des XRCC6BP1 Gens mittels <i>Integrative Genomics Viewer</i>	S. 45
8. Häufigkeit von SNVs in Abhängigkeit des Gens	S. 56
9. Nukleotid-Änderungen bei SNVs	S. 58
10. Bekannte/unbekannte SNVs bei Patienten	S. 60
11. Homozygote/heterozygote SNVs bei Patienten	S. 61
12. Häufigkeit von Genen mit gefundenen SNVs bei DNA-Reparaturmechanismen	S. 62
13. Anzahl von SNVs bei DNA-Reparaturmechanismen	S. 63
14. Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Amplifikate	S. 64

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich bedanke mich

bei **Herrn Prof. Dr. med. Christian A. Schmidt** für die Vergabe des Themas und ständige Förderung,

bei meinem Betreuer, **Herrn PD. Dr. med. Carsten Hirt** für das Korrekturlesen meiner Arbeit, konstruktive Anmerkungen, seine Warmherzigkeit, Hilfsbereitschaft sowie enorme Geduld,

bei Frau **Claudia Gand** für die Einarbeitung in die Laborarbeit und große Hilfe bei der Durchführung von Experimenten,

bei Frau **Kathrin Aßmus** für die Hilfe bei technischen Problemen und Fragen zu den verwendeten Methoden,

bei Herrn **Dr. Piotr Grabarczyk** für interessante Diskussionen und Ideen,

bei **meinen Kollegen der Transplantstation**, insbesondere **Schwester Anne und Anke** für die humorvolle Unterstützung in schwierigen Momenten,

und meiner besten Freundin **Philine**, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte.