

Bedeutung der LOH Analyse für die Identifizierung von Tumorgenen

Dieter Niederacher, Matthias W. Beckmann, Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Abbildung nur in der Druckversion

Abb 1
Analyse des „Loss of heterozygosity“ (LOH) des BRCA2 Gens

Elektrophoretogramm fluoreszenz-markierter PCR-Produkte nach Amplifikation der Mikrosatellitensequenzen des *BRCA2* Markers D13S267 und Auftrennung mittels eines DNA-Sequenzierautomaten (A.L.F.express, Pharmacia Biotech, Freiburg)

N: Normal-DNA
T: Tumor-DNA
N1/T1: homozygot Allel 150bp,
nicht informativ
N2/T2: heterozygot Allele 150 und 162 bp,
kein LOH
N3/T3: heterozygot Allele 150 und 156 bp,
Allelverlust (LOH) des 156 bp Allels
(Signalreduktion 90%)

Bei der Suche nach erblichen Gendefekten bei Karzinomkrankungen wurden in jüngster Vergangenheit beachtliche Erfolge erzielt. Hinweise auf die chromosomale Lokalisation eines Suszeptibilitätsgens ergaben sich durch die Suche nach gehäuft auftretenden Allelverlusten in der DNA sporadischer Tumoren mittels LOH (loss of heterozygosity) Analysen. Dieser Ansatz beruht auf dem 1971 von Knudson für das Retinoblastom beschriebenen theoretischen Konzept für die somatischen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen sowohl in hereditären als auch sporadischen Karzinomkrankungen.

Tumorsuppressorgene (TGS) sind per Definition (Tumor-) Wachstum unterdrückende Gene. Sie halten ihre Funktion aufrecht, solange ein intaktes Allel des rezessiven Gens exprimiert wird. Die Inaktivierung beider Allele kann zu unphysiologischem, malignem Zellwachstum führen. Der Schlüsselschritt innerhalb der Knudson'schen Zwei-Schritt-Hypothese ist die somatische Inaktivierung des rezessiven Tumorsuppressorgens, die zumeist durch den Verlust der zweiten (Wildtyp-) Kopie des Gens (Allelverlust bzw. LOH) vollzogen wird. Das verbleibende Allel in der Tumor DNA ist bereits zuvor in einem ersten Schritt durch eine Keimbahnmutation oder eine somatische Mutation inaktiviert. In der LOH Analyse werden polymorphe Marker zum spezifischen Nachweis homologer Allele eingesetzt. Hierbei haben sich sogenannte „Mikrosatelliten“ Marker mit variabler Anzahl von kurzen Di-, Tri-, oder Tetra-Nukleotid Wiederholungen

als äußerst nützlich und den klassischen RFLP-Markern (Restriktionsfragment-Längen Polymorphismen) überlegen gezeigt. Aufgrund ihrer hohen Variabilität und Verteilungsdichte im Genom sind die meisten Individuen bezüglich dieser polymorphen Marker heterozygot, d.h. in der zu untersuchenden chromosomalen Region lassen sich bei den meisten Individuen genügend informative Marker analysieren, um einen Allelverlust in der Tumor-DNA nachweisen zu können.

Durch die verschiedene Anzahl von Repeat-Einheiten innerhalb dieser Mikrosatellitensequenzen, ergeben sich nach PCR-Amplifikation dieser kurzen Markersequenzen mittels flankierender Primer in Normal-DNA informativer Individuen zwei in der Größe verschiedene DNA-Fragmente, die sich elektrophoretisch auftrennen und durch entsprechende Färbetechniken nachweisen lassen. Als vorteilhaft hat sich hier der Einsatz fluoreszenz-markierter Primer in der PCR und die DNA-Fragmentanalyse auf DNA-Sequenzierautomaten erwiesen, durch die eine hohe elektrophoretische Auftrennung und eine direkte quantitative Detektion der Allelsignale erreicht werden kann. LOH in der Tumor DNA zeigt sich durch Verlust bzw. signifikante Reduktion eines der beiden in der Normal-DNA nachweisbaren Allelfragmente.

Der Verlust an genetischem Material in der Entwicklung von Tumoren ist eine bekannte cytogenetische Beobachtung. Demzufolge entspricht es den Erwartungen, daß durch die LOH Analyse in sporadischen Karzinomen je

nach Tumorart ein verschieden hoher Hintergrund an zufälligen Allelverlusten nachzuweisen ist (Beckmann et al., 1997). Die Signifikanzschwelle, über der ein gehäuft Allelverlust nach der Knudson'schen Hypothese auf ein in dieser Region lokalisiertes Tumorsuppressorgen hinweist, ist nicht einheitlich festzulegen. Die Frage ob ein häufig nachzuweisender Allelverlust einer bestimmten chromosomalen Region ursächlich an Tumorentstehung und -entwicklung beteiligt ist oder nur zufälliger Effekt anderer genetischer Alterationen, ist durch die alleinige LOH-Analyse sporadischer Karzinome nur schwer zu beantworten. Der Nachweis eines kausalen Zusammenhangs zwischen Allelverlust und Tumorerkrankung und die Identifizierung der daran beteiligten Tumorsuppressorgene ist daher bislang nur durch Kopplungsanalysen familiärer Tumorerkrankungen gelungen (eine Übersicht gibt Tabelle 1).

Die Funktionen und Lokalisation der Genprodukte der so identifizierten Tumorsuppressorgene sind dabei sehr unterschiedlich. Intranukleär lokalisierte Genprodukte fungieren als Transkriptionsfaktoren (RB, TP53, WT1), in DNA-Reparaturmechanismen (MSH2, MLH1) oder in der Zellzykluskontrolle (BRCA1/2, TP53), die intrazellulären als Integratoren des Zytoskletts (NF2), Kinaseinhibitoren (MTS1) oder in der Katenin-Bindung (APC) und die transmembranären z. B. als GTPase aktivierendes Protein (NF1). Obwohl den meisten bekannten TSGs Kontrollfunktionen in übergeordneten Regulationsnetzwerken zukommen, scheinen sie dennoch eine organspezifische Bedeu-

Tab 1 Familiäre Tumorerkrankungen und daran beteiligte Gene

Syndrom	Chromosomen-Lokalisation	Gen
Hereditärer non-polyposis Kolonkarzinom (HNPCC)	2p15	MSH2
	3p21	MLH1
	7p22	PMS2
von Hippel-Lindau Erkrankung	3p25	VHL
Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)	5q21	APC
Familiäres Melanom	9p21	INK4A
	12q	CDK4
Tuberöse Sklerose Typ 1	9q34	TSC1
Basalzell-Nävus (Gorlin)-Syndrom	9q31	PTCH
Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2	10q11	RET
Wilms-Tumor	11p13	WT1
Beckwith-Wiedemann-Syndrom	11p15	BWS
Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1	11q13	MEN1
Retinoblastom	13q14	Rb
Familiäres Mamma-/Ovarialkarzinom	13q12	BRCA2
	17q21	BRCA1
Tuberöse Sklerose Typ 2	16p13	TSC2
Li-Fraumeni-Syndrom	17p13	TP53
Neurofibromatose Typ 1	17q11	NF1
Neurofibromatose Typ 2	22q12	NF2

tung in der Tumorgenese zu besitzen. Die im Rahmen der Entdeckung des Retinoblastom-Gens entwickelte Inaktivierungshypothese postulierte bei vorliegender Keimbahnmutation im RB Gen einen gewebespezifischen Funktionsverlust nach RB Allelverlust in Retinazellen. Obgleich LOH der RB Genregion auch in anderen Zell- und Gewebetypen nachweisbar ist, sind Tumoren anderer Organe eher die Ausnahme. Bei anderen hereditären Tumorgenese dagegen ist eine Tumorart dominierend (z.B. MSH2, MLH1 und PMS2 für Kolon; BRCA1, BRCA2 für Mamma und Ovar), zusätzlich treten weitere Tumorentitäten mit deutlich erhöhter Inzidenz in den Familien auf (z.B. MSH2, MLH1 und PMS2 für Endometrium, Gehirn, sonstiger Gastrointestinaltrakt; BRCA1, BRCA2 für Prostata, Endometrium, Pankreas, Kolon). Zusätzlich zu der prädisponierenden Keimbahnmutation sind daher organspezifische Tumorpromotions-Faktoren zu vermuten.

Beispielhaft für die Entdeckung erblicher, prädisponierender Gene war die mit der Strategie des „positionellen Klonierens“ identifizierte Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 in Familien mit hoher Inzidenz von Brust- und Eierstockkrebs zu einem relativ frühen Zeitpunkt (early-onset). Grundlage für gezielte Kopplungsanalysen war in beiden Fällen die signifikante Häufung von Allelverlusten (LOH) im Bereich 17q21 (BRCA1) bzw. 13q12 (BRCA2) in sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen.

Das für die Entdeckung des BRCA1-Gens eingesetzte statistische Modell basierte auf komplexen Segregations-Analysen von 1500 Familien mit multiplen Fällen von Mammakarzinomen (Hall et al., 1990). Das zugrundeliegende hereditäre Risiko konnte hier durch einen autosomal dominanten Erbgang erklärt werden. Auffällig in dieser Untersuchung war die Erkrankungshäufigkeit der jungen Frauen. Die Lokalisation des unbekanntes hereditären Karzinomgens BRCA1 konnte zuerst auf einen 12 centiMorgan Bereich (D17S250 bis D17S588), nach weiterer Analyse auf den 4 cM Bereich zwischen THRA1 bis D17S579 eingeschränkt werden. Nach wiederholter Identifizierung neuer polymorpher Marker in dem so eingegrenzten Bereich und der damit möglichen Charakterisierung von weiteren informativen Rekombinationsereignissen in BRCA1 gekoppelten Familien gelang es, den Bereich für die Lokalisation des BRCA1 Gens auf einen etwa 600 kb großen Abschnitt (D17S1321 und D17S1325) einzuengen und dort lokalisierte Kandidatengene auf prädisponierende Mutationen hin zu überprüfen (Neuhausen et al., 1994). Letztendlich gelang es dem Team um Mark Skolnick mit dieser Strategie des positionellen Klonierens 1994, das BRCA1 Gen zu identifizieren (Miki et al., 1994).

In analoger Weise verlief die Klonierung des BRCA2 Gens. Nachdem die primären Kopplungsanalysen einen Bereich von ca. 6 cM (13q12-q13) für die Lokalisation des BRCA2 Gens wahrscheinlich gemacht hatten, wurde hier eine entscheidende Eingrenzung

der mutmaßlichen BRCA2 Genregion erzielt durch die in diesem Zusammenhang eher zufällige Entdeckung eines somatischen, homozygoten Allelverlustes zwischen den Markern D13S171 und D13S260 in einem sporadischen Pankreas Karzinom (Schutte et al., 1995). Nach gezielter Analyse des so fokussierten Bereichs gelang der Gruppe um Stratton die endgültige Identifizierung des BRCA2 Gens (Wooster et al., 1995).

Für beide Gene BRCA1/2 konnte die Funktion als Tumorsuppressorgen analog dem Knudson'schen Modell durch LOH Analysen der Tumoren betroffener Familienmitglieder bestätigt werden. In mehr als 85% der untersuchten informativen Tumoren von BRCA1/2 Mutationsträgerinnen konnte der Verlust des Wildtypgens nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß jeweils die intakte Genkopie etwa mit gleicher Häufigkeit vom Vater oder von der Mutter vererbt wurde. Neben der Möglichkeit Rückschlüsse auf die genetische Herkunft der Mutationen oder die Beteiligung von Phänomenen wie z.B. genomisches Imprinting zu ziehen, kann die LOH Analyse von familiären Tumoren zu verbesserten Kopplungsanalysen beitragen. Unter Einbeziehung des Allelverlustes in der Tumor DNA (Tumor-Genotyp) in Linkage-Analysen kann die notwendige Zahl betroffener Familienmitglieder um den Faktor 2-5 verringert werden, um eine vergleichbare Kopplungs-Wahrscheinlichkeit (LOD Score) zu errechnen (Rebeck et al., 1994). Damit sind wesentlich mehr Familien durch Kopplungsanalysen auswertbar, was vor dem Hintergrund klei-

ner werdender Familien und zunehmendem Generationsalter vornehmlich in den westlichen Ländern die Aussagekraft von Kopplungsanalysen deutlich steigern kann.

Die hohe LOH Rate in Tumoren von Familienmitgliedern mit nachgewiesener prädisponierender Mutation ermöglichen den Einsatz der LOH Analyse in der genetischen Analyse weiterer betroffener Familienmitglieder. Insbesondere in den Fällen bereits verstorbener Verwandten, von denen ausschließlich archiviertes Tumorgewebe zur Verfügung steht, kann die LOH Analyse nach Mikrodisektion von Tumor- und Normalgewebe einen ersten, möglicherweise den einzigen Hinweis auf das Vorhandensein einer Mutation erbringen bzw. eine Mutation mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Als einfach durchzuführende Methode ist die LOH Analyse ebenfalls zur Untersuchung von „Multi-Cancer“ Familien geeignet. In BRCA2 gekoppelten Familien konnte mit hoher Frequenz LOH 13q12-q13 in den in diesen Familien ebenfalls auftretenden Prostata-, Ovarial-, Cervix-, Colon- und männlichen Mammakarzinomen nachgewiesen werden. In analoger Weise zeigte sich nach LOH Analysen von Tumoren in von Hippel-Lindau Familien und in MEN1-gekoppelten Familien eine hohe Rate an LOH der VHL- bzw. der MEN1-Genregion, die die Bedeutung des jeweiligen Tumorsuppressorgens innerhalb der Karzinogenese der verschiedenen Tumoren dieser familiären Karzinomsyndrome belegen, oder aber, wie am Beispiel der Analyse von familiären Wilm's Tumoren gezeigt, auf die Beteiligung von zwei distinkten Genregionen hindeuten (McDonald et al., 1998).

Im Gegensatz zu hereditären Karzinomerkrankungen ist die Anwendung des Knudson'schen Modells für die Entstehung sporadischer Karzinome problematisch. Der klassischen, für das Retinoblastom gültigen Hypothese folgend, sollten familiär prädisponierende Tumorsuppressorgene auch in der Karzinogenese sporadischer Tumoren beteiligt sein. Im Widerspruch hierzu ist z.B. die Bedeutung der

BRCA1/2 Gene in sporadischen Mama- und Ovarialkarzinome nach wie vor ungeklärt. So gelang es bis heute nur in wenigen nicht familiären Ovarialkarzinomen, somatische BRCA1 Mutationen nachzuweisen (Merajver et al., 1995). Obwohl der in sporadischen Mamakarzinomen gehäufte Allelverlust von Chromosom 17q21 mit Blick auf die Knudson'sche Hypothese der Ausgangspunkt für die erfolgreiche Identifizierung des BRCA1 Gens war, fehlt bis heute der eindeutige Nachweis für eine BRCA1 Beteiligung bei sporadischen Tumoren. Alternative Inaktivierungsmechanismen wie die Reduktion der BRCA1 Expression infolge des Gendosis-Effekts nach Allelverlust, cis-regulatorische Mutationen oder Methylierung sind derzeit Gegenstand der Untersuchungen. Ebenso können weitere Kandidatengene in unmittelbarer Nachbarschaft zum BRCA1 Gen postuliert werden. Allelverluste in Tumoren sind selten auf enge Bereiche begrenzt, sondern betreffen oft größere chromosomale Abschnitte bis hin zu häufigem Verlust eines ganzen Chromosomenarms. Durch detaillierte LOH Analyse mit einer höheren Markerdichte in den entsprechenden Regionen können in einem Teil der Tumoren Deletionsmuster nachgewiesen werden. Nach möglichst genauer Kartierung der Deletionsgrenzen lassen sich analog zu genetischen Rekombinationsereignissen in Kopplungsanalysen, gemeinsame Deletionsbereiche (SRO, Smallest region of overlap) identifizieren. Im Falle des BRCA1 Gens konnte so in den Tumoren mit LOH 17q21 der Bereich der Lokalisation potentieller Tumorsuppressorgene in der Nähe des BRCA1 Gens weiter eingegrenzt werden (Niederacher et al., 1997).

Literaturverzeichnis

- Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch HG, Gusterson BA, Bender HG: Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumor heterogeneity. *J Molecular Medicine* 1997; 75: 429-439
- Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ: The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996; 77(11):2318-2324
- Devilee P, Cornelisse CJ: Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 113-130.
- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LE, Huey B, King M-C: Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250: 1684-1689

Knudson AG Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.

Merajver SD, Pham TM, Caduff RF, Chen M, Poy EL, Cooney KA, Weber BL, Collins FS, Johnston C, Frank TS. Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumours. *Nat Genet* 1995; 9: 439-443

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71

Neuhausen SL, Swensen J, Miki Y, et al.: A P1-based physical map of the region from D17S776 to D17S78 containing the breast cancer susceptibility gene BRCA1 *Hum Mol Genet* 1994; 3 (11): 1919-1926

Niederacher D, Picard F, van Roeyen CRC, An HX, Bender HG, Beckmann MW: Patterns of allelic loss on chromosome 17 in sporadic breast cancer detected by fluorescent labelled microsatellite analysis *Genes Chrom Cancer* 1997; 18: 181-192

McDonald JM, Douglass EC, Fisher R, Geiser CF, Krill CE, Strong LC, Virshup D, Huff V: Linkage of familial Wilm's tumor predisposition to chromosome 19 and a two-locus model for the etiology of familial tumors. *Cancer Res* 1998; 58: 1387-1390

Rebbeck TR, Lustbader ED, Buetow KH: Somatic allele loss in genetic linkage analysis of cancer. *Genet Epidemiol* 1994; 11: 419-429

Schutte M, da Costa LT, Hahn SA, Moskaluk C, Hoque ATMS, Rozenblum E, Weinstein CL, Bittner M, Meltzer PS, Trent JM, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE: Identification by representational difference analysis of a homozygous deletion in pancreatic carcinoma that lies within the BRCA1 region. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1995; 92: 5950-5954

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al.: Identification of the breast cancer gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-792

Korrespondenzadresse

Dr. Dieter Niederacher
Molekulargenetisches Labor
Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität, Moorenstr. 5,
40225 Düsseldorf,
Tel/Fax 0211-81-15319
niederac@uni-duesseldorf.de