

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war die Ermittlung der Gendosen im Tumorgewebe im Bereich des Promotors und des Exon 1-Intron 1-Übergangs des EGFR-Gens. Dazu wurde die differentiell-kompetitive PCR verwendet. Zusätzlich wurde zur Analyse der polymorphen Sequenz im Intron 1 eine weitere Untersuchung auf Basis der PCR durchgeführt. Diese ermöglichte die Bestimmung von LOHs und RERs. Die Ergebnisse der Patientinnen (Population A) und der nicht erkrankten westfälischen Frauen (Population B) wurden mit einander, mit einer CEPH-Vergleichspopulation und mit in meiner Arbeitsgruppe untersuchten Japanerinnen (Population C) verglichen. Zusätzlich wurden die bestimmten intratumoralen Konzentrationen an EGF- und ErbB-2-Rezeptoren der Population A mit den übrigen Ergebnissen in Zusammenhang gesetzt

Das für diese Arbeit verwendete Probenmaterial, in Form von EDTA-antikoaguliertes Blut und Tumorgewebe, stammte aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde in Münster. Neben fünf Frauen mit Mammakarzinomrezidiv und acht Patientinnen mit benignem Tumor wurden 78 Mammakarzinompatientinnen (Population A) untersucht. Die Proben wurden in der Zeit vom 7.11.1992 bis zum 10.4.1997 entnommen.

Die isolierte Leukozyten-DNA der 98 nicht erkrankten, westfälischen Frauen (Population B) stammte aus der PROCAM-Studie des Instituts für Arterioskleroseforschung in Münster.

Bei der Auswertung der differentiell-kompetitive PCR im Promotorbereich und im Übergang Exon 1-Intron 1 wurde bei 20,4 Prozent der Patientinnen der Population A eine Genalteration festgestellt. Dabei beliefen sich 3,8 Prozent auf

Genamplifikationen im Promotorbereich und 16,6 Prozent auf Gendeletionen. Die häufigen Deletionen des EGFR-Gens im Exon 1-Intron 1-Übergang (11,5 Prozent) weisen auf den Verlust eines größeren Anteils des EGFR-Gens hin. Dieses Ereignis ist nach ZENKLUSEN et al. 1994 ein häufiges Ereignis in der primären Brustkrebsentwicklung und weist auf die Beeinflussung eines in der Region liegenden Tumorsuppressorgens hin.

Bei der Bestimmung des Polymorphismusses wurde bei 43,6 Prozent der Patientinnen der Population A eine Genalteration festgestellt. Dabei waren 28,2 Prozent LOHs und 15,4 Prozent RERs. Häufig traten die Genalterationen in niedrigen Tumorstadien auf. Die Analyse des Polymorphismusses gab ebenfalls Aufschluß über die Allellängen. Bei den Frauen der Population A und B war der Anteil der Frauen mit zwei Allelen über 122 Basenpaare unter zehn Prozent. Das Allel mit der Länge 118 Basenpaare trat dagegen am häufigsten auf. Die untersuchten Frauen zeigten im Verhältnis zu den Frauen der CEPH-Vergleichspopulation oder der Population C vermehrt kürzere Allele.

Homozygote Patientinnen zeigen kaum Genalterationen. Bei vier von neun Frauen mit einem LOH in der Polymorphismusregion des Intron 1 treten Deletionen im Exon 1-Intron 1-Übergang auf. Ein LOH im Polymorphismusbereich des Intron 1 zusammen mit Deletionen im Promotorbereich konnten jedoch bei den Patientinnen nicht festgestellt werden. Dies legt die Vermutung nahe, daß Gendeletionen im Polymorphismus des Introns 1 bis in den Übergang Exon 1-Intron 1 reichen. Sie erstrecken sich aber nicht bis in den Promotorbereich.

Nur eine Patientin zeigt eine homozygot vererbtes EGFR-Gen und gleichzeitig Deletionen im Promotor- und im Exon 1-Intron 1-Übergang. Die Frau befand sich zum Zeitpunkt der primären chirurgischen Therapie im Tumorstadium sieben.

Die intratumoralen Konzentrationen von EGFR und ErbB-2 zeigen einen prozentualen Anstieg des prognostisch ungünstigen Gehaltes mit zunehmendem Tumorstadium. Dabei ist zum einen interessant, daß bei Genalterationen des EGFRs im Polymorphismusbereich des Intron 1 anscheinend ein Funktionsgewinn des ErbB-2 einhergeht und zum anderen der Rezeptorgehalt trotz LOH nicht absinkt.

Der scheinbare Widerspruch der erhöhten intratumoralen Konzentration des EGFRs bei gleichzeitiger Deletion im Intron 1 könnte wie folgt erklärt werden: GEBHARDT (1998) stellte fest, daß die Allellänge des Polymorphismusses im Intron 1 die Flexibilität der DNA in diesem Bereich bestimmt. Mit abnehmender Allellänge steigt die Flexibilität der DNA. Bei kurzen Allellängen ist es möglich, daß sich die beiden Enhancer, die sich gegenseitig verstärken, räumlich näher kommen und damit die Expression des Rezeptors erhöhen. Dies könnte auch zu einer erhöhten Disposition für ein Mammakarzinom führen. Mikrodeletionen, wie in dieser Arbeit als Gendosisalterationen im Bereich des CA tandem-repeats und Exon 1-Intron 1-Übergangs bestimmt, führen in ähnlicher Weise zu einer Verkürzung der Sequenz. Damit verhalten sich Tumore mit LOH oder RER wie Gewebe mit kürzeren Allelen des EGFR-Polymorphismus.

Hutmacher, Kirsten:

Screening of the promotor-exon 1-intron 1-domain of the EGF-receptor for mutations (deletions and length variations) in breast cancer

## 6 SUMMARY

The purpose of this work was the determination of gene dosage in tumor tissue at the promotor sequence and the exon 1-intron 1 area of the EGFR gene. Therefore the differential-competitive polymerase chain reaction was used. Additionally for the analysis of the polymorphic sequence inside intron 1 an other investigation was made on basis of the polymerase chain reaction. This made the examination of LOHs and RERs possible. The results of the patients (population A) and of the healthy women (population B) were compared with each other, with the CEPH-reference population and with japanese women investigated by my working group (population C). Additionally the intratumoral protein concentration of EGFR and ErbB-2 were connected to the population A.

The samples used for this work, blood and tumor tissue, stemed from the "Klinik und Polyklinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde" at Muenster. Besides five tumors of women with relapse and eight patients with benign tumors 78 primary breast cancer patients (population A) were examined. The samples were collected from November 7<sup>th</sup>, 1992 until April 10<sup>th</sup>, 1997.

The isolated DNA of the 98 healthy women (population B) I got from the "PROCAM-Studie of the Institut für Arterioskleroseforschung" at Muenster.

The evaluation of the differential-competitive polymerase chain reaction at the promotor sequence and exon 1-intron 1 area showed an aberration of the gene for 20,4 per cent of the primary breast cancer patients. 3,8 per cent of those were gene amplifications at the promotor sequence and 16,6 per cent were gene deletions. The frequent deletions of the EGFR gene at the exon 1-intron 1 area (11,5 per cent) refer to the loss of a larger part of the EGFR gene. This event is frequent in primary breast cancer and points out the influence of a putative regional tumor suppressing gene as reported by ZENKLUSEN (1994).

The examination of the polymorphic sequence established an aberration of the gene for 43,6 per cent of the patients of the population A. 28,2 per cent of those were LOHs and 15,4 per cent were RERs. Often the aberrations appear at the lower tumor stages. The analysis of the polymorphic sequence yield the allele lengths. All patients presented both alleles longer than 122 bp with less than 10 per cent and the allele length of 118 bp appears the most frequently. Women of a CEPH-reference population or population C showed more short alleles.

Homozygous patients seldom show any aberrations of the gene. Four out of nine women with LOH at the polymorphic sequence also showed deletions in the exon 1-intron 1 region. A LOH at the polymorphic sequence inside intron 1 could not be found together with deletions at the promotor sequence. This strongly supports the assumption that gene deletions at the polymorphic sequence in intron 1 extend to the exon 1-intron 1 region, but they do not extend into the promotor sequence.

Just one patient transmitting homozygous EGFR polymorphism had deletions at the promotor sequence and at exon 1-intron 1 region. At the time of primary surgical therapy the woman had the tumor staging 7.

The intratumoral protein concentration of EGFR and ErbB-2 showed on a percentage basis an increase with rising tumor staging. Thereby on the one hand it is interesting that the aberrations of the EGFR gene at the polymorphic sequence in intron 1 apparently coincides with an additional increase of the ErbB-2 function and on the other hand the receptor concentration does not drop by LOH

The seeming contradiction about the increased intratumoral protein concentration of EGFR and the deletion inside intron 1 at the same time could be explained as follows.

GEBHARDT (1998) established that the *allele length* of the polymorphic sequence in intron 1 determines the flexibility of the DNA in this area. With decreasing allele length rises the flexibility of the DNA. Existing short allele lengths make it possible that enhancer 1 in the promotor region gets closer to enhancer 2 and increase the receptor's expression. This could coincide with an increased pre-disposition for breast cancer. Microdeletions, as found in this work, as aberration of the gene in the polymorphic sequence and the exon 1-intron 1 region, in similar way lead to a reduced sequence. Thereby tumors with LOH or RER behave like tissues with shorter alleles of the EGFR's polymorphic sequence.