

II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar

( Direktor: Univ.- Prof. Dr. R. M. Schmid)

K-Ras-Mutationen im Blut bei Patienten mit Pankreaskarzinomen

Martina Mayr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. - Prof. Dr. R. M. Schmid
2. Univ. - Prof. Dr. M. Sarbia

Die Dissertation wurde am 27.01.2005 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.09.2005 angenommen.



den Patienten

## **INHALTSVERZEICHNIS:**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG:</b>	<b>7</b>
1.1	Familie der Ras-Gene:	7
1.2	Signaltransduktion durch Ras-Proteine	8
1.3	Ras und Tumorgenese	11
1.4	Nachweis von Ras-Mutationen	15
1.5	Ras-Mutationen bei gastrointestinalen Tumoren	17
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG / ZIELSETZUNG:</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
3.1	Patientenauswahl	25
3.2	Probensammlung und Konservierung	25
3.2.1	Blutproben	25
3.2.2	Sekretproben	25
3.2.3	Gewebeproben / Paraffinblöcke	25
3.2.4	Kontrollzelllinien	26
3.3	DNA-Isolation	27
3.3.1	DNA-Isolation aus Vollblut / Zellsuspension	27
3.3.2	DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten	29
3.3.3	Konzentrationsbestimmung der DNA	30
3.4	PCR und Verdau	31
3.4.1	PCR-Version I: Nested-PCR	31
3.4.2	Enzymverdau und RFLP	33
3.4.3	PCR-Version II: Zwischenstufen und Endversion	34
3.4.4	Kontaminationskontrollen	36
3.5	Gelanalyse und Gelextraktion	37

3.5.1	Verwendete Gele, Loading-Buffer und DNA-Marker	37
3.5.2	Gelanalyse der PCR-Produkte:	39
3.5.3	Gelextraktion der PCR-Produkte	40
<b>3.6</b>	<b>Klonierung der PCR – Produkte</b>	<b>41</b>
3.6.1	Aufreinigung der PCR-Produkte	41
3.6.2	Präparation der DNA-Enden	41
3.6.3	Ligation mit dem T 4 – Vektor	42
3.6.4	Transformation kompetenter E.coli	43
3.6.5	Bakterienkultivierung	43
<b>3.7</b>	<b>Plasmidpräparation</b>	<b>45</b>
<b>3.8</b>	<b>Sequenzierung und Auswertung der Sequenzanalysen</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE:</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Methode I : Mismatch-PCR Version1 und Enzymverdau</b>	<b>47</b>
4.1.1	Etablierung der Mismatch-PCR „Version1“ und Ermittlung der Sensitivität	47
4.1.2	Modifikation des Enzym- Verdau	49
4.1.3	Sequenzanalyse der Mutationen nach PCR Version 1	51
<b>4.2</b>	<b>Entwicklung der Methode II: Modifikationen von PCR und Verdau</b>	<b>53</b>
4.2.1	Einsatz des Restriktionsenzym während der PCR	53
4.2.2	Modifikation der PCR-Bedingungen	54
4.2.3	Primer	57
<b>4.3</b>	<b>Endgültige Methode : PCR- Version II</b>	<b>57</b>
4.3.1	PCR-Resultate und Sensitivität	57
4.3.2	Sequenzanalysen	59
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>

<b>8</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b>	<b>91</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>93</b>
<b>12</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>94</b>

# 1 Einleitung:

## 1.1 Familie der Ras-Gene:

Die bedeutende Rolle von Onkogenen bzw. Proto-Onkogenen wie den Ras-Genen für Zellwachstum und Tumorentstehung wurde innerhalb der letzten Jahrzehnte in verschiedensten Untersuchungen über die molekularen Grundlagen von Neoplasien deutlich.

Die **Familie der Ras-Gene** setzt sich aus den in enger Verbindung stehenden Proto-Onkogenen **K-Ras**, **H-Ras** und **N-Ras** zusammen. Die Bezeichnung stammt von „rat“ und „sarcoma“ (Barbacid, 1987, S.780), da die Ras-Gene erstmals im Genom bestimmter RNA-Sarkom-Viren bei Ratten (Kahn, 1987, S.640) gefunden wurden : H-Ras im Harvey-Sarkom-Virus und K-Ras im Kirsten-Sarkom-Virus. N-Ras wurde in den Zellen eines Neuroblastoms, nicht aber in Retroviren entdeckt (The oncogene and tumour suppressor gene factsbook, 1997, S.319).

Das humane **K-Ras-Gen** ist auf Chromosom 12 p12.1 lokalisiert und umfasst mehr als 35 kb, das **N-Ras-Gen** findet sich auf Chromosom 1 p13 mit 7 kb und das **H-Ras-Gen** auf Chromosom 11 p15.5 mit 3 kb (Bos, 1988, S.256; Marshall, 1985). Es existieren zwei Isoformen des K-Ras-Gens: K-Ras-A und K -Ras-B. Darüberhinaus hat die Familie der Ras-Gene noch weitere Mitglieder mit abnehmender Übereinstimmung der genetischen Sequenzen.

Jedes der Ras-Gene besitzt fünf Exons, wobei das erste nicht kodiert; die übrigen vier kodieren für das transformierende Protein p21 ras (oder Ras), ein integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Die Expression von Ras (insbesondere K-Ras) findet in allen Zellen statt, auch wenn Analysen der mRNA unterschiedlich hohe Expressionsraten in verschiedenen Geweben erbrachten: starke Expression von H-Ras in Haut und Skelettmuskel, von K-Ras in Dickdarm und Thymus und von N-Ras in männlichen Keimzellen und Thymus (Macaluso, 2002, S. 125; Lowy, 1993).

## 1.2 Signaltransduktion durch Ras-Proteine

**Ras-Proteine** übernehmen nach ihrer Verankerung mittels eines Farnesylrestes an der cytosolischen Membranseite eine wichtige Rolle bei der Kopplung von Wachstumsfaktoren und Effektorproteinen. Auf diese Weise kommt ihnen eine Schlüsselstellung innerhalb der Regulation von Zelldifferenzierung und Zellwachstum zu (Molecular cell biology, 2000, S.1071). Daß aktiviertes Ras für die Induktion der DNA-Synthese notwendig ist, konnte bereits 1984/85 in Versuchen an kultivierten NIH/3T3-Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß veränderte, konstitutiv aktive Ras-Proteine auch ohne vorangehende Ligandenbindung diesen Effekt aufweisen (Mulcahy et al., Nature 313, 1985, S.241; Feramisco et al., Cell 38, S. 109).

Bezüglich der Struktur herrscht bei den drei „Haupt“-Ras-Proteinen weitgehende Übereinstimmung in der Abfolge der ersten 165 Aminosäuren, die 25 Aminosäuren der carboxyterminalen Region variieren jedoch. Durch posttranslationale Modifikationen dieser Region ab Aminosäure 186 werden die Proteine mehr oder weniger hydrophob, wodurch ihre Bindungsfähigkeit an die Plasmamembran definiert und ihre weitere Funktion limitiert ist.

Zur „GTPase-Superfamilie“ gehörend liegt das Ras-Protein entweder in der aktiven GTP-bindenden Form oder in der inaktiven GDP-bindenden Form vor. Nach Ankopplung bestimmter Wachstumsfaktoren erfolgt unter Mitwirkung von GEF (Guaninnucleotid-Austauschfaktor) und GAP (GTPase-aktivierendes Protein) die reversible Umwandlung der inaktiven in die aktive Konformation, wobei anschließend durch Hydrolyse des GTPs GDP und Pi wieder abgelöst werden (Molecular cell biology, 2000, S.872-873).



Abbildung 1:

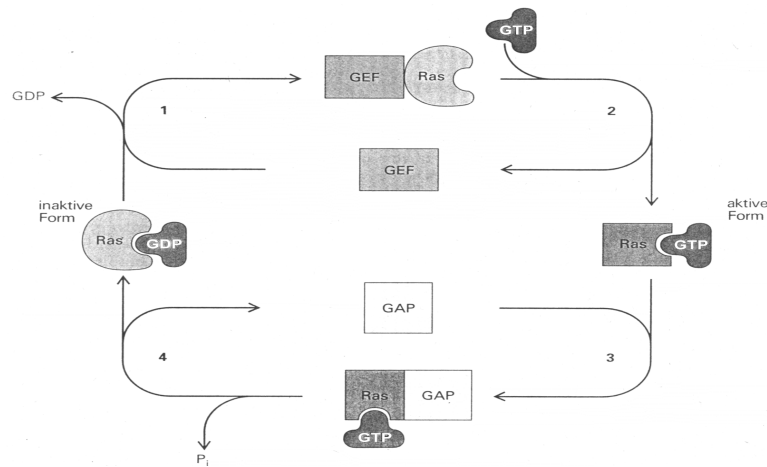


Abbildung 1: reversible Umwandlung der inaktiven GDP-haltigen Form des Ras-Proteins in die aktive GTP-gebundene Form (Figure 20-22, Molecular cell Biology, 2000, S.873):

- (1) Guaninucleotid-Austauschfaktor (GEF) erleichtert die GDP-Ablösung von Ras
- (2) GTP wird gebunden, unter Freisetzung von GEF entsteht der aktive Ras/GTP-Komplex
- (3)/(4) durch Hydrolyse entsteht wieder die inaktive Form Ras/GDP (beschleunigt durch GTPase-aktivierendes Protein = GAP)

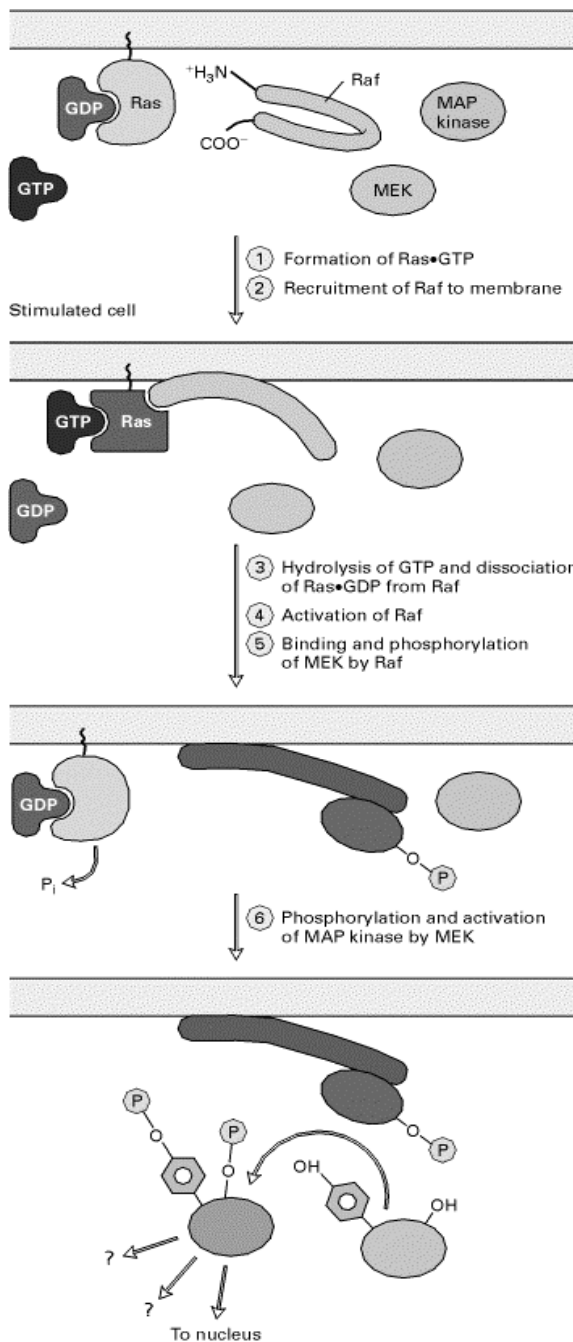


Abbildung 2: Kinase-Kaskade -  
Schemazeichnung (Figure 20-28, Molecular cell biology, 2000, S. 879)

1+2) aktiviertes Ras bindet die N-terminale Domäne von Raf

3 – 5) aktiviertes Raf bindet und phosphoryliert MEK

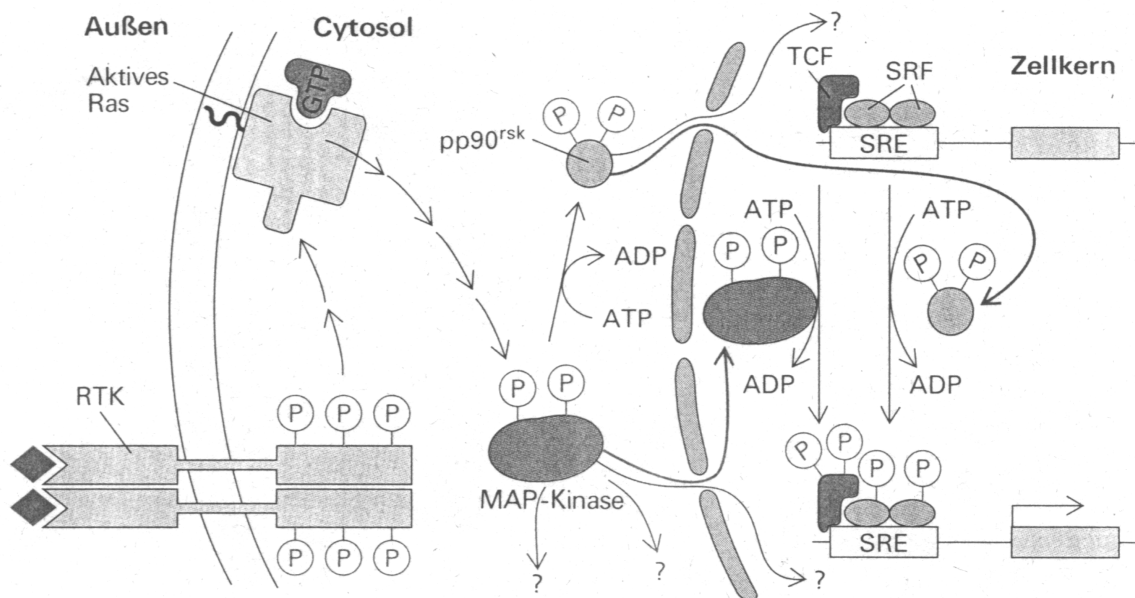
6) MEK phosphoryliert die MAP-Kinase

Nach Aktivierung des Ras-Proteins erfolgt die Signalweiterleitung über eine spezifische Kaskade von Proteinkinasen. Die Haupteffektoren von Ras sind die RAF-Kinase, RAL-GEFs und PI3-K ( Phosphatidylinositol-3-Kinase). Sie binden alle an die gleiche Region der aktiven Ras-GTP-Konformation, die Domäne 32-40. Durch die Bindung an Ras erhöht sich ihre jeweilige Aktivität und es kommt zu einer Beschleunigung der nachfolgenden „Pathways“. Am besten bekannt ist die RAF-Signalkaskade: So koppelt RAF, eine Serin / Threonin-spezifische Proteinkinase, an

aktiviertes Ras, wodurch eine Konformationsänderung von RAF erfolgt. Eine neue, katalytisch aktive RAF-Form entsteht (Macaluso, 2002, S. 127).

In den weiteren Schritten erfolgt die Bindung und Phosphorylierung von MEK, einer Proteinkinase, die ihrerseits Serin- und Tyrosinreste der MAP-Kinasen (Mikrotubulus-assoziierten Protein- oder Mitogen-aktivierten Proteinkinasen) phosphoryliert und damit deren katalytische Aktivität stimuliert.

Abbildung 3: RTK-Ras-Signalweg (Figure 20-48, Molecular cell biology, 2000, S. 902)



Die aktivierten MAP-Kinasen entwickeln ihre Effekte auf verschiedenen Wegen; so können sie Zellwachstum und – differenzierung sowohl über die Bereitstellung von Transkriptionsfaktoren als auch über die Phosphorylierung von Substratproteinen beeinflussen. Darüberhinaus ist wiederum der Anstoß weiterer „Pathways“ in Form einer Signalkaskade möglich (Molecular cell biology, 2000, S.902/903).

### 1.3 Ras und Tumorigenese

Die Rolle der Ras-Onkogene bei der Karzinogenese ist seit langer Zeit Inhalt zahlreicher Untersuchungen und Forschungsansätze. Erstmals wurden die

Eigenschaften veränderter Ras-Gene in Transfektions-Assays an Maus-Zelllinien 1981 festgestellt. Über aktiviertes Ras bei menschlichen Tumoren berichteten Murray et al. ebenfalls bereits 1981. Sie fanden Mutationen im K-Ras-Gen bei der Kolonkarzinomzelllinie SW 480 (Murray et al., 1981, S.355-361), wobei das transformierende Gen damals noch nicht als menschliches Homolog zum Kirsten-Virus-Onkogen identifiziert war (Kahn et al., 1987, S. 640). Inzwischen bestätigt der Nachweis von Ras-Mutationen bei ungefähr 70% der Neoplasien die bedeutende Rolle von Ras bei Zellwachstum und Differenzierung (Macaluso et al., 2002, S.128). Obwohl die kausalen Zusammenhänge zwischen der Entstehung der Mutationen und ihren möglichen Auslösern noch nicht vollständig erforscht sind, stellte sich der **Einfluß äußerer Faktoren**, wie z.B. mutagener Chemikalien, in verschiedenen Versuchen deutlich dar. Dabei fand sich auch eine Abhängigkeit, sowohl zwischen Art der mutagenen Substanz und Häufigkeit der Mutation als auch zwischen Art der Substanz und Typus des mutierten Gens. Auch durch Röntgenstrahlen ließen sich experimentell speziell Punktmutationen des Ras-Proto-Onkogens in Lymphomen auslösen, und ebenso bekannt ist die mutagene Wirkung von Viren (Spandidos et Field, 1990, S.2).

Unterschiedliche Effekte je nach Mutation von K-, H- oder N-Ras in den weiteren Auswirkungen auf das Geschehen in der Zelle ließen sich jedoch nicht beobachten. Daher führt man die jeweilige **Spezifität der mutagenen Potenz** auf unterschiedliche Expressionsniveaus und nicht auf unterschiedliche „Funktionsweisen“ der einzelnen Ras-Gene zurück; zumal jeder der drei Vertreter für das eine Ras-Protein kodiert (Bos, 1989, S.4682-4684).

Sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen des Gens sind im Zusammenhang mit Karzinogenese von Bedeutung. Im Vordergrund stehen dabei die qualitativen Änderungen, insbesondere in Form von Punktmutationen, welche man bei menschlichen Tumoren gehäuft im ersten Exon an Codon 12 und 13 sowie im zweiten Exon an Codon 59 und 61 findet (Kahn et al., 1987, S.640; Macaluso et al., 2002, S.128).

Die onkogene Potenz durch quantitative Änderungen der genetischen Struktur der Ras-Gene wurde in den Versuchen von Chang et al. 1982 bewiesen; Ras-Protoonkogene bewirkten unter Einfluß eines starken Promoters eine Transformation von NIH / 3T3 – Zellen (Chang et al., 1982, S.479-484). Die Einschleusung multipler Gen-Kopien in eine Empfängerzelle hatte den gleichen Effekt und in vielen Tumoren

lässt sich eine enorm verstärkte Expression von Ras-Genen nachweisen (Kahn et al., 1987, S.641).

Die Mutationen im Genom spiegeln sich in den Konformationsänderungen der dreidimensionalen **Struktur der Ras-Proteine** und den entsprechenden Funktionsänderungen bzw. -verlust wieder:

Der Austausch einer Aminosäure im Ras-Protein als Folge der Basenmutation führt dabei zur Konformationsänderung der GTP-bindenden Domäne. Am häufigsten wird bei den Punktmutationen das Guanin am Ende von Codon 12 im Wildtyp durch Adenin oder Thymin ersetzt, wobei die Angaben in Abhängigkeit vom Primärtumor variieren. Ein Verlust der GTP-hydrolysierenden Eigenschaft des Ras-Proteins ist die Folge und es kommt zur bereits erwähnten Daueraktivierung der Signalkaskade, d.h. ohne vorangehende Bindung des spezifischen Wachstumsfaktors erfolgt eine dauerhafte Signalgebung durch Anstoß der spezifischen Proteinkinasen.

Auch hier ließ sich die Bedeutung im Wachstumszyklus durch Versuche mit permanent aktiven Raf-Proteinen an Zellkulturen aufzeigen; konstitutiv aktives Raf kann man in Tumorzellen nachweisen. Auf den direkten Zusammenhang zwischen Ras und Raf konnte man nach Experimenten schließen, in denen selbst permanent aktives Ras bei Vorliegen einer defekten Raf-Form kein Wachstum der kultivierten Zellen induzieren konnte (Molecular cell biology, 2000, S. 922).

Ob es sich bei der Alteration vom Proto- zum Ras-Onkogen um ein Ereignis zu Beginn oder eher in den späten Phasen der Malignitätsentwicklung handelt und ob eine Aktivierung des Onkogens unabdingbar an die Entstehung oder die Existenz eines Tumors gebunden ist, war lange unklar. Für einige Tumorentitäten, wie u.a. Schilddrüsen-, Lungen-, Kolon-, Pankreaskarzinome und hämatologische Malignome, existieren zwar genauere Vorstellungen über den Zeitpunkt der Ras-Mutation im Verlauf der Malignitätsentwicklung, eine genaue Zuordnung jedoch bleibt auch hier letztendlich unmöglich und Rückschlüsse lassen sich lediglich anhand der Beobachtungen ziehen, wann und wo sich mutiertes Ras in welchen Zellen einer Tumorart und ihrer prämaligen Vorstufen nachweisen läßt (Bos, 1989, S.4684-4687). Im Bereich der gastrointestinalen Tumoren wurden die letzten Jahren zunehmend Erkenntnisse über Ras-Mutationen in prämaligen Vorstufen bzw. Dysplasien gewonnen, worauf bezüglich der Kolon- und Pankreaskarzinome unter Punkt 1.5 noch genauer eingegangen wird.

Unumstritten ist aber, daß die Onkogene in allen Stadien der Karzinogenese eine Rolle spielen können (Spandidos et Field, 1990, S.2) und ihre Expression mitunter auch für den Fortbestand eines transformierten Phänotyps notwendig ist (Kahn et al., 1987, S. 642). Dies zeigten Perucho et al. 1986 in ihrer Arbeit über die reversible Induktion von TGF alpha bei menschlichen Ras-Genen (Perucho et al., 1986, S.81-91).

Die Aktivierung des Ras-Onkogens ist nur ein Schritt im vielschichtigen Prozess der Karzinogenese, nur im Zusammenwirken mit anderen Faktoren erlangt Ras seine Bedeutung bei der Tumorentstehung. Zu diesen Faktoren zählen u.a. sowohl die Effekte zusätzlicher Transkriptions- und Wachstumsfaktoren als auch der Ausfall von bestimmten Tumorsuppressorgenen wie p53 oder MTS 1 (Caldas et Kern, 1995, S.1).

Darüberhinaus gibt es Untersuchungen, in denen aktiviertes Ras in unmutierten, „gesunden“ Zellen zu finden war. Vermutlich ist in diesem Fall die Expressionsrate zu gering oder das mutierte Ras bewirkt bei diesem Zelltyp keine Stimulation des Wachstums. In Experimenten an embryonalen Rattenfibroblasten konnte das mutierte Ras-Gen keine Transformation auslösen, ähnliche Versuche an embryonalen Hamsterfibroblasten gelangen aber unter dem zusätzlichen Einsatz viraler Transkriptions-Enhancer (Kahn et al. , 1987, S. 642).

Ein Anhalt besteht auch dafür, daß Ras-Mutationen in bestimmten Zelltypen einen bestimmten (histologischen) Tumortypus induzieren (Bos, 1989, S.4683).

## 1.4 Nachweis von Ras-Mutationen

Transfektionsversuche an Mäuse-Fibroblasten machten - wie bereits unter 1.3 aufgeführt - erstmals den Nachweis von mutiertem Ras möglich. Allerdings ließ sich mit dieser Methode keine größere Anzahl von Tumoren untersuchen und es bestand die Gefahr der DNA- Degradierung im Verlauf der Prozeduren (Bos, 1987, S.293; Bos,1988, S.258). Dennoch ergaben sich Hinweise auf die Lokalisation der Mutationen und weitere Untersuchungen der Tumor-DNA selbst schlossen sich an (Bos, 1989, S.4682).

Um die Probleme der „ biological assays „ zu umgehen, setzte man zur weiteren Analyse von Ras-Mutationen sowohl Methoden ein, die auf der direkten Identifizierung der aktivierenden Mutationen in der DNA oder RNA basieren, als auch Vorgehen, die immunologisch die veränderte Aminosäure nachweisen (Bos, 1988, S 258).

Mit Einführung der „Polymerase Chain Reaction“, der PCR, 1985 eröffnete sich die Möglichkeit, gezielt die interessierenden DNA-Bereiche zu amplifizieren, so auch die Ras-Sequenzen nach der DNA-Isolierung aus Tumorgewebe etc. Die fast unbegrenzte Vervielfältigung der entsprechenden Genabschnitte war Grundlage für die zahlreiche weitere Analyseverfahren, wie u.a. direkte Sequenzierung, Dot-Blot-Hybridisierung mit allel-spezifischen Oligonukleotiden, Analyse von Restriktionsfragmentlängenpoly-morphismen (RFLP) und Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP) (Sugano, 1993, S. 361).

Zwar war es möglich geworden die PCR-Produkte nach entsprechender Vervielfältigung direkt zu sequenzieren (McMahon et al., 1987; Collins, 1988), aber insgesamt ist dieses Verfahren relativ aufwendig und für die klinische Routine ungeeignet.

Zur Dot-Blot-Hybridisierung werden gereinigte Nucleinsäureproben z.B. aus PCR-Amplifikaten auf Filter aufgetragen und anschließend mit spezifischen, markierten Oligonukleotiden hybridisiert. Bewirkt der Basenaustausch den Verlust oder die Entstehung einer Schnittstelle für eine Endonuklease, ist aufgrund dieses Merkmals eine Unterscheidung durch gelelektrophoretische Auftrennung möglich. Die Identifikation kann dann z.B. mittels Southern-Blots erfolgen (Kahn, 1987, S.640). Dabei werden die DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Trennung und Denaturierung auf eine Nylon-oder Nitrozellulosemembran für die anschließende

Hybridisierung übertragen (Newton et Graham, 1994, S.188). Da nur einige der Mutationen direkt Veränderungen von Enzymschnittstellen bewirken, ließen sich auf diesem Weg nur wenige von ihnen analysieren. Daher versuchte man den Einsatz spezifischer, synthetischer Oligodesoxynukleotide und modifizierte die Bedingungen für Hybridisierung und Southern-Blot. Zwar gelang so die Darstellung von Mutationen an spezifischer Position, ein Screening längerer Genabschnitte war aber nicht durchführbar.

Der Austausch einer einzigen Base, die Punktmutation, läßt sich auch aufgrund von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen feststellen. Eine andere Detektionsmethode beruht auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten von Wildtyp- und mutierter DNA.

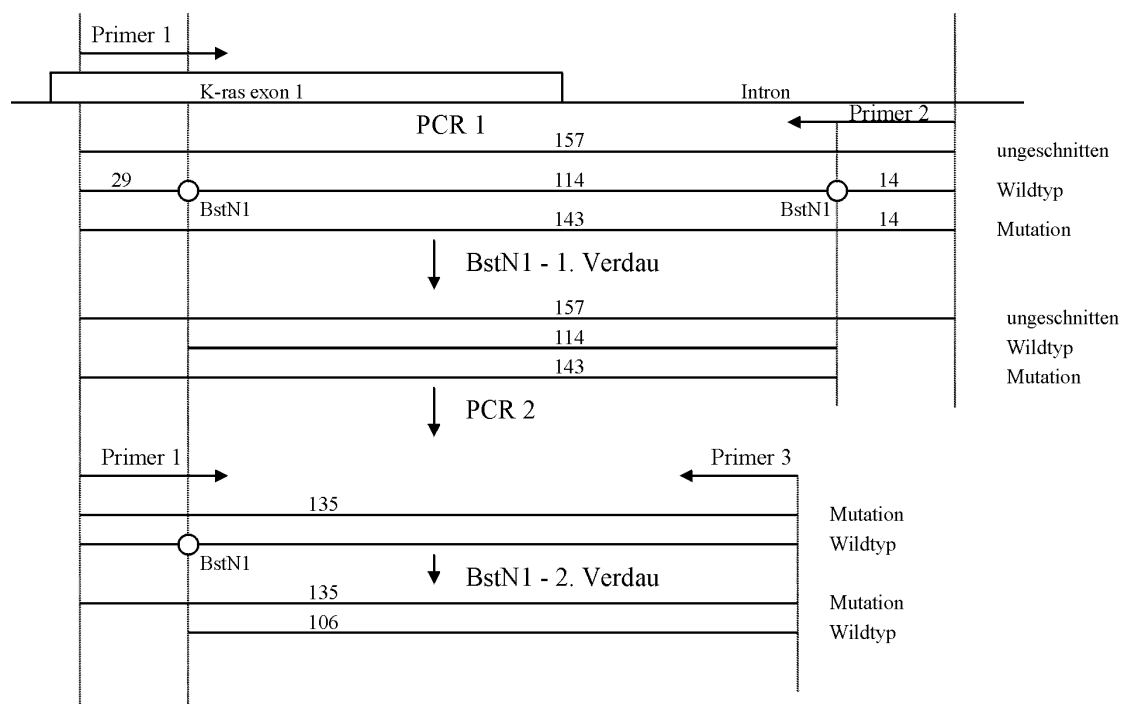
Im weiteren Verlauf entwickelten Kahn und seine Mitarbeiter die „RNase A-mismatch-cleavage“ : die komplette, zelluläre RNA wird mit markierter, synthetischer antisense-RNA hybridisiert; sollte die zelluläre RNA mutierte Transkripte enthalten, entstehen RNA-Komplexe mit „single base mismatches“, d.h. Stellen, an welchen eine Base nicht komplementär zur hybridisierten ist. Ein Verdau mit RNase A produziert Fragmente, deren Länge abhängig von der Lokalisation der „Mismatches“ und damit vom Ort der Mutation ist; eine weitere Auftrennung und sogar eine gewisse quantitative Einschätzung ermöglicht die Gelelektrophorese (vgl. Arbeiten von Almoguera, siehe auch unter 1.5 ).

In letzter Zeit wurde v.a. die kombinierte Methode von Mismatch-PCR und RFLP verwendet, die wir auch für unsere Untersuchungen auswählten. Levi hat dieses Vorgehen 1991 mit dem Ras-Nachweis bei cholangiozellulären Karzinomen als äußerst sensitive Technik etabliert (Levi et al., 1991, S. 3497-3502). Aus Paraffinschnitten gewonnene DNA wurde als Matrize einer ersten PCR eingesetzt, in der durch entsprechende Primerwahl (mismatch-Primer in sense und antisense-Richtung) ein 157-Basenpaar langes Fragment amplifiziert wurde. Bei unmutiertem Codon 12 entstanden in dieser ersten PCR zwei Schnittstellen für das ein Restriktionsenzym BstN1; lag eine Mutation einer der ersten beiden Basen von Codon 12 vor, ergab sich nur eine BstN1- Schnittstelle. Im anschließenden BstN1-Verdau zerfiel das ursprünglich 157-Basenpaar lange Fragment dementsprechend entweder in 29-, 114- und 14 bp-Fragmente beim Wildtyp oder in 143- und 14-bp-Fragmente bei Mutation. Das Produkt der ersten PCR wurde in der zweiten PCR mit



einem neuen antisense-Primer vervielfältigt, es entstand ein Fragment von 135 Basenpaaren mit einer Schnittstelle für BstN1 bei unmutiertem Codon 12. Daher ergab sich nach dem zweiten Verdau mit BstN1 für den Wildtyp ein 106 bp-Stück, bei einer Mutation im Codon 12 konnte das Enzym auch hier nicht schneiden und das Fragment blieb 135bp lang. Eine entsprechende Auftrennung und Sichtbarmachung erfolgte entsprechend dem RLFP durch anschließende Gelelektrophorese. Levi behauptet durch dieses Verfahren der selektiven Amplifikation des mutierten Genabschnittes ein verändertes Allel unter 1000 unmutierten Allelen entdecken zu können. Damit schien eine äußerst sensitive Methode gefunden, die neue Möglichkeiten der klinischen Nutzung bringen sollte (siehe 1.5).

Abbildung 4: Schemazeichnung nested-PCR nach Levi



## 1.5 Ras-Mutationen bei gastrointestinalen Tumoren

Der Nachweis von mutiertem Ras lässt sich bei zahlreichen Tumoren führen, allerdings bestehen hinsichtlich der Inzidenz erhebliche Unterschiede. Während in Brusttumoren z.B. fast nie Ras-Mutationen festzustellen sind, finden sich bei Schilddrüsenkarzinomen in ca. 50 % der Fälle mutierte Formen aller drei Vertreter

der Ras-Familie. Melanome sowie hämatologische Tumoren wie die myeloische Leukämie dagegen enthalten in bis zu 30% hauptsächlich mutiertes N-Ras. Neben den Lungen-Tumoren mit über 30% ist die Inzidenz der Ras-Mutationen bei **gastrointestinalen Tumoren** wie den Kolonkarzinomen mit über 50% und den Adenokarzinomen des Pankreas mit bis zu 90% am höchsten. Bei diesen Tumorentitäten zeigen sich fast ausschließlich Alterationen des K-Ras-Onkogens (Bos, 1989, S. 4682-4687).

Für die Entstehung von **Kolonkarzinomen** hat sich inzwischen das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz etabliert. Über ein kleines, meist tubulöses bzw. tubulovillöses Adenom entwickelt sich mit zunehmender Größe und abnehmender Differenzierung bzw. zunehmendem Dysplasiegrad in mehreren Schritten ein invasives Adenokarzinom des Darmes. Dabei finden sich Ras-Mutationen nicht nur im Karzinomgewebe selbst, sondern auch bereits bei den Adenomen. In Abhängigkeit von der Größe sind die Mutationen in 20 % (bei kleinen, tubulären Adenomen) bis zu 50% nachweisbar, wobei nicht jeder „Ras-mutierte“ Kolontumor auch eine Mutation in den Vorstufen aufweist (Bos, 1987, S 295/296). Eine Korrelation zwischen verändertem Gen und Tumortyp, Tumorlokalisation, Invasionstiefe oder Alter und Geschlecht des Patienten fällt nicht auf. Die überwiegend im Codon 12 des K-Ras-Gens gefundenen Mutationen bestehen in der Mehrheit in einem Austausch des zweiten Guanins eines GG-Paares, wobei das Guanin am häufigsten durch ein Adenin oder Thymin ersetzt wird (Bos, 1989, S.4684/4685).

Das Zusammenspiel der Ras-Mutationen mit anderen genetischen Veränderungen, wie z.B. denen des Tumorsuppressorgens p 53, bei der Entstehung von Kolonkarzinomen zu verstehen, ist vor allem hinsichtlich der klinischen Relevanz wichtig - zumal das Kolonkarzinom eine der Tumorentitäten mit der höchsten Inzidenz in den europäischen Ländern ist. Zwar konnten in den letzten Jahren therapeutisch gewisse Erfolge erzielt werden, aber die 5-Jahres-Überlebensraten ab dem Stadium Dukes C, d.h. jegliches T-Stadium der TNM-Klassifikation mit dem Befall von Lymphknoten, sind mit ca. 30 % immer noch schlecht. Außerdem wäre eine Verbesserung der prognostischen Aussagemöglichkeiten wünschenswert.

Im Vordergrund dieser Arbeit standen die **Karzinome des exokrinen Pankreas**, wobei es sich in 75-80 % der Fälle um duktale Adenokarzinome handelt. Viel seltener kommen Plattenepithel-, Zystadeno- und Azinuszellkarzinome vor.

Das Pankreaskarzinom ist ein häufiger, hochmaligner Tumor mit einer ausgesprochen schlechten Prognose; die mittlere Überlebensrate nach Diagnosestellung liegt zwischen 3 und 6 Monaten, die 5-Jahres-Überlebensrate bei 3-5%. Frühzeitig erfolgt eine lymphogene Metastasierung in die regionalen Lymphknoten und das Peritoneum; hämatogene Absiedlungen finden sich häufig in Leber, Lunge, den Nebennieren und den Knochen.

Trotz zahlreicher Anstrengungen konnten auch mit multimodalen Therapieansätzen die Überlebenszeiten kaum verlängert werden. Zusätzlich sind die diagnostischen Möglichkeiten bei diesem rasch wachsenden und schnell metastasierenden Karzinom oft unbefriedigend, zumal sich eine klinische Symptomatik meist erst im fortgeschrittenen Tumorstadium zeigt. In der Bildgebung gelingt die Differenzierung zwischen Malignom und benignen Gewebeveränderungen bei chronisch entzündlichen Prozessen der Bauchspeicheldrüse, ebenso wie die Einschätzung der Operabilität (Chance einer R0-Resektion) bei Karzinomen, nur unzureichend. Dabei bietet nur eine frühzeitige chirurgische Intervention -wenn überhaupt- die Chance einer kurativen Behandlung.

Von detaillierteren Erkenntnissen über die Rolle mutierter Ras-Gene beim Pankreaskarzinom und insbesondere vom Zusammenhang zwischen Mutationszeitpunkt und Tumorentstehung bzw. Tumorstadium, erhofft man sich neue Optionen für eine effektivere Diagnostik und Therapie dieses Tumors.

Erste Hinweise auf die Bedeutung des Ras-Onkogens für Tumoren der Bauchspeicheldrüse brachten Untersuchungen an transgenen Mäusen mit mutiertem H-Ras. Diese Tiere entwickelten direkt nach der Expression eines pankreas-spezifischen Promoters Neoplasien des fetalen Pankreas, die meist alle Azinuszellen erfassten (Quaife et al., 1987).

Durch die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden, insbesondere durch die Etablierung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), wurde es möglich, mutierte Gen-Abschnitte selbst bei kleinsten DNA-Mengen nachzuweisen, zu amplifizieren und so anschließend für weitere Analysen nutzbar zu machen (siehe 1.4 ).

Bei den dukталen Adenokarzinomen werden mit 70 bis zu 90 % die höchsten Nachweisraten von mutiertem Ras beschrieben. Die Mutationen sind beim

Menschen mit hoher Spezifität im Codon 12 des K-Ras-Gens zu finden, selten auch an Stelle 13 oder 61. Bezüglich des Mutationstyps gibt es unterschiedliche Studienergebnisse; teils ist der Austausch des ersten Guanins ( GGT ), d.h. Glycin, gegen ein Thymin ( TGT ), d.h. Cystein, gehäuft, teils gegen ein Cytosin (Bos, 1989, S.4685).

1988 veröffentlichte Almoguera Untersuchungen an gefrorenem (Operationspräparate) und in Paraffin eingebettetem (aus Autopsien) Tumormaterial; dabei ließ sich bei 21 von 22 (95%) exokrinen Pankreaskarzinomen eine Mutation des K-Ras-Gens feststellen. Die Gewebeschnitte wurden nach histopathologischer Beurteilung entparaffiniert und einer PCR unterzogen. Unter Verwendung des Klenow-Fragments (E.coli-Polymerase) und der spezifischen Primer erfolgte eine gezielte Amplifizierung des ersten kodierenden Exons des K-Ras-Gens. Das Amplifikat wurde mit einer exakt dem ersten Exon des K-Ras-Gens komplementären RNA-Probe hybridisiert und die Hybride mit RNase A verdaut. Die Analyse im denaturierenden Polyacrylamidgel zeigte je nach Mutation in unterschiedlicher Länge entstandene Banden. Untersuchte Metastasen enthielten dabei Mutationen analog zum Primärtumor, wogegen sich weder in normalem Pankreasgewebe noch in den untersuchten Gallenblasenkarzinomen mutiertes Ras fand. (Almoguera et al., 1988)

Um die Art der Ras-Mutation genau darzustellen, wurden in mehreren Experimenten einer japanischen Forschungsgruppe die Amplifikate der „Ras-PCR“ direkt sequenziert. Dabei fand sich in allen 18 untersuchten Pankreaskarzinomen eine Mutation des K-Ras-Gens; unter den 12 mitanalysierten Karzinomen der extrahepatischen Gallenwege entdeckte man nur eine, unter den 9 Gallenblasenkarzinomen keine Mutation. Bei den Pankreaskarzinomen handelte es sich ausschließlich um Veränderungen am Codon 12, wobei der Austausch von Guanin (GGT) gegen Adenin (GAT) am häufigsten war. (Tada et al., 1989, S.930-935)

Nach der gleichen Methodik verarbeitete die Gruppe um Tada auch Gewebeproben aus Feinnadelbiopsien und Aspiraten. Ziel war es, eine klinische Nutzung, v.a im Bereich der interventionellen Diagnostik, zu ermöglichen. Die Nachweisrate für die Mutation erreichte sogar bei den äußerst kleinen Gewebefragmenten nahezu die 100%, die man bei den Gewebelöcken gefunden hatte. Insbesondere wurden erstmals die Differenzierung unklarer Raumforderungen des mittleren Abdomens

sowie Veränderungen der chronischen Pankreatitis mituntersucht, dabei wurde mutiertes Ras nur bei den Malignomen des Pankreas gefunden und ein gewinnbringender Einsatz zur Differentialdiagnostik schien möglich (Tada et al., 1991, S.233-238).

Bereits zeitgleich zur „RNAse A Cleavage-Methode“, wie sie Almoguera praktizierte, diente auch die Hybridisierung mit synthetischen Oligonukleotiden zum indirekten Nachweis einer mutierten Gensequenz.

So stellten Masson und Andren-Sandberg 1992 im Anschluß an eine PCR mit den Primern für Codon 12, 13 und 61 durch Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotiden die genaue Art der Mutation fest. Sie fanden unter 9 Pankreastumoren 7 Mutationen an Codon 12 und eine an Codon 13. Hervorgehoben wurde damals, daß bei dieser Methode keine vorherige Mikrodisektion zur Trennung von Tumor- und Normalgewebe nötig sei. (Masson et Andren-Sandberg, 1992, S.421-424)

Die Studie mit den größten Probenzahlen nach diesem Verfahren führten 1993 Hruban und Mitarbeiter durch; sie entdeckten bei 69 von 82 Pankreaskarzinomen (83%) im Gewebe des OP-Präparates oder des Paraffinschnittes Ras-Mutationen. Der Austausch der einzelnen Basen deckt sich mit den Ergebnissen von Tada 1989. Hruban behauptet in dieser Arbeit - wie in der Literatur bereits vorbeschrieben -, daß keine Korrelation zwischen Ras-Mutation und Proliferationsindex des Tumors oder Überleben des Patienten bestünde (Hruban et al., 1993, S.545-554).

Es entstanden in Folge noch zahlreiche Arbeiten, die Ras-Mutationen mit der Methode der PCR-Amplifizierung mit anschließender Hybridisierung in Tumorproben aus OP-Präparaten, Paraffinschnitten und Feinnadelbiopsien sowie zytologischen Proben aus Pankreas- und Duodenalsaftaspiraten untersuchten. Dabei ließen sich Mutationen bei den Karzinomen in einem stets sehr hohen Prozentsatz nachweisen. 1993 erschien eine Studie, in der sich nach PCR und Hybridisierung bei einigen Proben zwei verschiedene Punktmutationen im Tumorgewebe zeigten. Dies wurde als Beweis für eine multizentrische Lokalisation der Karzinome gewertet (Motojima et al., 1993, S.138-143).

Parallel wurde die Restriktionsenzym-Mismatch-Polymerase-Kettenreaktion verwendet, die Levi erstmals 1991 in seinen Versuchen zur Ras-Detektion bei Cholangiozellulären Karzinomen beschrieben hatte (siehe 1.4.). Auch mit dieser Methode gelang es mehreren Arbeitsgruppen, Ras-Mutationen im Gewebe von

Pankreaskarzinomen regelmäßig mit vergleichbar hohen Prozentsätzen nachzuweisen.

Um mit weniger invasiver Diagnostik als den Punktaten und Feinnadelbiopsien klinische Anwendung für die Ras-Detektion zu finden, war der Nachweis in Pankreas- und Galleflüssigkeit Inhalt zahlreicher Studien. Erstmals untersuchten Miki et al. 1993 in 41 Fällen endoskopisch gewonnenen Pankreassaft mit der Methode von PCR und RFLP. Die PCR gelang bei 9 Pankreaskarzinomen; bei 6 war eine Ras-Mutation im Codon 12 zu finden. Alle Proben der Negativkontrollen und nicht-malignen Erkrankungen waren „Ras-negativ“, d.h. zeigten den Gen-Wildtyp. (Miki et al., 1993, S. 145-148)

Es folgten mehrere Veröffentlichungen über eine mögliche Verbesserung der Diagnostik des Pankreaskarzinoms durch Detektion von Ras-Mutationen im Pankreassekret, wobei der Nachweis unter Verwendung aller gebräuchlichen Methoden erbracht werden konnte.

Tada hatte bereits 1993 parallel zu den ersten Experimenten mit Pankreassekret versucht, über den Ras-Nachweis im Blut zirkulierende Tumorzellen aufzudecken, wobei nur das periphere Blut von 6 Patienten untersucht wurde (Tada et al., 1993, S. 2472-2474).

Diese Möglichkeit griffen 1998 Mulcahy und Mitarbeiter. wieder auf und machten eine prospektive Studie über den Nachweis mutierter Ras-Gene im Blutplasma von Karzinompatienten. Die DNA von 21 Patienten mit Pankreastumor zeigte in 17 Fällen (81%) eine K-Ras-Mutation. Falls Gewebe des Primärtumors verfügbar war, wurde auch dieses mit PCR und anschließender Sequenzierung analysiert; es fanden sich durchweg die nämlichen Mutationen im Tumor selbst wie im Plasma. Weitere Studien, um die Validität für den klinischen Gebrauch zu sichern, wurden dringend gefordert (Mulcahy et al., 1998, S. 271-275).

Auch die Nachweismöglichkeit im Stuhl von Patienten mit Pankreaskarzinomen wurde überprüft, im Hinblick auf die Entwicklung eines „Genokult“-Tests. Caldas fand Mutationen im Stuhl von Karzinompatienten in 6 von 11 Fällen, in 2 von 3 Fällen bei cholangiozellulären Karzinomen und in 1 von 3 Fällen bei chronischer Pankreatitis. Der Basenaustausch entsprach bei den Karzinomen dem im Primärtumor, bei den restlichen Proben fand sich eine Übereinstimmung mit den Mutationen der identifizierten muzinösen Zellhyperplasien des Pankreasgangepithels (Caldas et al., 1994, S. 3568-3573).

Anstoß zu weiteren Überlegungen und insbesondere zur Beurteilung, inwieweit die Untersuchungen auf Ras-Mutationen zur Tumordiagnostik geeignet sind, gaben Veröffentlichungen über Ras-Mutationen bei muzinösen Zellhyperplasien des Pankreas (Yanagisawa et al., 1993, S.953-956). Denn bereits 1992 hatte Lemoine über die Aktivierung von Ras in präinvasiven Karzinomen berichtet (Lemoine et al., 1992, S.230-236). In den letzten Jahren entstand vergleichbar der Adenom-Karzinom-Sequenz der Kolonkarzinome ein Tumorprogressionsmodell für das duktales Pankreaskarzinom. Das invasive Pankreaskarzinom ist dabei Endstufe einer Entwicklung von der flachen Epithelhyperplasie (PanIN-1A) über die papilläre Hyperplasie ohne (PanIN-1B) oder mit Atypien (PanIN-2) zu einem Carcinoma in situ (PanIN-3). Dabei weist man Punktmutationen im K-Ras-Gen bereits in bis zu 30% der frühen PanIN-Veränderungen nach (Schneider et al., 2003, S. 165).

## **2 Fragestellung / Zielsetzung:**

Im Rahmen vielfältiger Untersuchungen an Ras-Genen und ihren mutierten Formen wurden multiple Methoden zu ihrem Nachweis etabliert (1.4.), im Gegenzug eröffnete die Anwendung neuer molekularbiologischer Verfahren wiederum weiterführende Möglichkeiten auf dem Gebiet der „Ras-Forschung“.

Nachdem der Nachweis mutierter Ras-Gene im Tumorgewebe selbst und in Pankreassekreten geführt worden war, fand man „Ras“ auch im Blutplasma und in Stuhlproben von Tumorpatienten.

Unsere Untersuchungen sollten zeigen, ob der Nachweis von K-Ras-Mutationen durch Mismatch-PCR und RFLP auch im peripheren Vollblut von Tumorpatienten möglich ist. Das Pankreaskarzinom war hierbei die in erster Linie untersuchte Tumorentität- insbesondere auch im Hinblick auf mögliche Abgrenzung zur chronischen Pankreatitis . Daneben wurden zur umfassenderen Beurteilung des Verfahrens auch Proben von Patienten mit cholangiozellulären und Kolonkarzinomen miteinbezogen.

Sollte sich die verwendete Methode als ausreichend spezifisch und sensitiv erweisen, zirkulierende Tumorzellen in der Leukozytenfraktion des Blutes aufzuspüren, hofften wir eine Korrelation der Nachweisgrenze mit dem jeweiligen Tumorstadium auszumachen. Darüberhinaus hätte über die Veränderung der Tumorzellausaat ins Blut auf diesem Weg der Verlauf bzw. das Ansprechen einer zytostatischen Therapie beobachtet werden können.



## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Patientenauswahl**

Auf sämtlichen Stationen der II. Medizinischen Klinik für Innere Medizin des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München wurden im Zeitraum von Mai 1996 bis Ende 2000 Proben gesammelt. In erster Linie setzte sich das Patientengut wie folgt zusammen: Patienten mit V.a. Pankreasneoplasien, mit bereits diagnostizierten bzw. histologisch gesicherten Pankreaskarzinomen, Patienten mit chronischen Pankreatitiden, teils mit Pseudozystenentwicklung, Patienten mit akuten Pankreatitiden, Patienten mit Tumoren im Bereich der ableitenden Gallenwege und Gallenblasenkarzinomen, Patienten mit kolorektalen Karzinomen in verschiedenen Tumorstadien. Darüberhinaus wurden auch wenige Patienten mit anderen Tumorentitäten erfasst sowie mehrere Patienten der II.Med. Klinik ohne Tumorerkrankung als zusätzliche Kontrollgruppe. Ebenfalls zur Kontrolle wurden Blutproben mehrerer gesunder Probanden verwendet.

Um die Konstanz der Befunde zu überprüfen, wurden bei einigen der Tumorpatienten an mindestens 3 aufeinanderfolgenden Tagen Proben entnommen.

### **3.2 Probensammlung und Konservierung**

#### **3.2.1 Blutproben**

Die Blutproben wurden in 9 ml EDTA-Röhrchen abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung innerhalb der nächsten 12 Stunden bei 4°C aufbewahrt.

#### **3.2.2 Sekretproben**

Sekrete aus Pankreasgang und den Gallenwegen, die großteils aus ERCP-Untersuchungen und zum kleineren Teil aus perkutanen Drainagen (PTCDs/Yamakawa-Drainagen) stammten, wurden bis zur Präparation der DNA auf Eis gelagert bzw. transportiert.

#### **3.2.3 Gewebeproben / Paraffinblöcke**

Die in Paraffin gebetteten Gewebeproben stellte das Institut für Pathologie unseres Hauses zur Verfügung. Bei Raumtemperatur wurden mit einem Mikrotom Schnitte von 7 bis 10 µm Dicke angefertigt. Pro Probe wurden mindestens 2-3 Schnitte auf Objektträger aufgezogen oder zusammen zur weiteren Verarbeitung in ein steriles Reaktionsgefäß überführt.

#### 3.2.4 Kontrollzelllinien

Sowohl als Positiv – wie auch als Negativkontrolle wurde DNA aus Tumorzelllinien verwendet. Die Präparation der DNA erfolgte nach der gleichen Methode wie bei Vollblutproben.

Alle verwendeten Zellen wurden von der „ Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur“ bezogen. Die Zellen wurden als Gefrierstocks geliefert, die weitere Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei –196°C. Nach Auftauen bei 37°C wurden sie in Zellkulturflaschen aus Plastik (Polystyrol, Falcon) mit vorgelegtem, angewärmtem Medium ausgesät. Die Kultivierung der in Monolayern wachsenden Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%. Sobald die Kulturgefäße konfluent bewachsen waren, lösten wir die Zellen durch Behandlung mit Trypsin/EDTA (Gibco BRL, 0,25%) vom Boden der Kulturflaschen. Nach Inaktivierung des Trypsin/EDTA mit serumhaltigem Medium wurden die Zellen abzentrifugiert (300 g, 3min) und entweder zur Herstellung von Gefrierstocks mit Einfriermedium resuspendiert, oder zum Passagieren 1/5 bis 1/8 gesplittet, mit frischem Medium versetzt und für die weitere Kultivierung in neue Flaschen ausgesät.

Zelllinien	Medium	Ras
humanes Pankreasadenokarzinom		
PA-TU –8902, -8988S, -8988T	90% DMEM + 5% FCS + 2mM L-Glutamin	+
humanes Kolonadenokarzinom		
SW 480	90-95% RPMI 1640 + 5-10% FCS	+
HT 29	90% Mc Coy`s 5A + 10% FCS	+
Mäusefibroblasten		
3T3	90-95% DMEM + 5-10% FCS	-
humanes hepatozelluläres Karzinom		
HEP-G2	90% RPMI + 10% FCS	+

### 3.3 DNA-Isolation

#### 3.3.1 DNA-Isolation aus Vollblut / Zellsuspension

Die DNA-Präparation aus den Blutproben wurde nach folgender Methodik in mehreren Schritten durchgeführt:

Circa 9 ml Blut wurden in ein 50 ml-Probengefäß überführt und 15 min bei 1800 U/min zentrifugiert, das Plasma wurde als Überstand abgesaugt und verworfen. Der verbliebene Niederschlag (Pellet) wurde zur Lyse der Erythrozyten mit Aqua dest. auf 40 ml Endvolumen aufgefüllt und kräftig gemischt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 1800 U/min wurde wiederum der Überstand abgesaugt. Diesen Waschvorgang wiederholten wir je nach Bedarf zwei bis dreimal, um sämtliche Reste der Erythrozyten zu entfernen und ein Pellet aus Leukozyten und ggf. Tumorzellen zu erhalten. Zur letzten Säuberung wurde das Pellet mit PBS gewaschen, anschließend wurden die erhaltenen Zellen in Nukleid-Lysis-Puffer aufgenommen und bei - 20 °C eingefroren.

Zur weiteren Präparation tauten wir die Proben auf und gaben 200 µl SDS hinzu, nach kräftigem Mischen folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min.

Für den Proteinverdau wurden je 50 µl Proteinase K (Firma Boehringer Mannheim) zugegeben und die Proben über Nacht im 37 °C warmen Wasserbad geschüttelt. Nach kurzem Abkühlen im Kühlschrank schüttelten wir unter Zugabe von je 2 ml 5 M NaCl die Proben per Hand und stellten sie für 1 h auf Eis, um die Proteine auszusalzen.

Nach mindestens 15 min Zentrifugation bei 2500 U/min und 4°C konnte der klare Überstand in neue Probengefäße überführt werden. Zeigte sich noch trüber Bodensatz, mußte das Aussalzen wiederholt werden.

Zur Protein-Extraktion wurde das einfache Volumen an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Firma Roth) zugegeben, geschüttelt und zur Phasentrennung circa 30 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, wurde in ein neues Gefäß pipettiert. Durch Wiederholung des Vorganges mit Isoamylalkohol konnten wir auch noch letzte Phenolreste entfernen.

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von ungefähr dem zweifachen Volumen an eiskaltem 96 % Alkohol und nach Bedarf von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2. Nach Präzipitieren für mindestens 15 min auf Eis oder im Gefrierschrank bei - 20°C wurde die ausgefallene DNA nochmals mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Abzentrifugieren für circa 10 min bei 5000 U/min und 4°C saugten wir den Alkohol ab, das Pellet wurde in einer Vakuum-Glocke vollends getrocknet und dann in 100 bis 400 µl TE-Puffer gelöst.

Die weitere Lagerung erfolgte bei – 20 °C bzw. – 80 °C.

### **Materialien:**

#### **Phosphat gepufferte Saline(Salzlösung) - PBS :**

NaCl	16,0 g
KCl	0,4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,48 g
H <sub>2</sub> O	ad 2000 ml

#### **Nukleid-Lysis-Puffer:**

EDTA	25 ml
Tris-HCl	5 ml

NaCl        15 ml  
H<sub>2</sub>O        ad 500 ml  
HCl         pH 8,2

### **Sodiumdodecylsulfat (SDS) 20 %**

#### **Tris EDTA-Lösung (TE-Puffer einfach):**

Tris-HCl ( pH 8,0) 10 mM

EDTA    ( pH 8,0) 1 mM

Die Extraktion der genomischen DNA aus Vollblut erfolgte bei einem geringen Teil der Proben, v.a. bei den Negativkontrollen, mit dem Qiagen Blood Kit nach entsprechender Anleitung.

### **3.3.2 DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten**

#### **3.3.2.1 Entparaffinierung des Gewebes**

Zur Reduktion der Paraffinmenge wurden nach Möglichkeit die Gewebeanteile, die das interessierende Tumormaterial enthielten, aus den auf Objektträger aufgezogenen Schnitten mit einem sterilen Skalpell ausgekratzt und in sterile 2 ml Röhren (Tube) gegeben. Die Gewebemenge sollte gemäß den Vorschriften des entsprechenden Quiagen-Kits circa 25 mg nicht überschreiten.

Zur Paraffinentfernung wurde eine Extraktion mit Xylol durchgeführt: Dazu wurden 1200µl Xylol pro 2 ml Tube zugegeben und dann kräftig gemischt. Nach 5 min Zentrifugation bei Raumtemperatur und maximaler Umdrehungszahl ließ sich der Überstand vorsichtig abpipettieren; dabei sollte das Pellet nicht aufgewirbelt werden. Zur Entfernung eventueller Xylol-Reste gaben wir 1200µl Ethanol abs. zum Pellet, schüttelten kräftig und zentrifugierten erneut für 5 min bei RT und 18 000 g. Der Ethanol wurde abpipettiert und der Waschvorgang in gleicher Weise wiederholt. Anschließend trocknete das Pellet im geöffneten Tube für 10 –15 min bei 37°C, bis der noch verbliebene Alkohol verdampft war. Das entparaffinierte Gewebe wurde in 180 µl ATL-Puffer nach der Anleitung des QIAamp Tissue-Kits der Firma QIAGEN aufgenommen und entsprechend weiterverarbeitet.

### 3.3.2.2 DNA-Präparation aus entparaffinisierendem Gewebe:

Nach Entfernung des Paraffinanteils erfolgte die DNA-Präparation gemäß der Anleitung des QIAamp Tissue Kits der Firma QIAGEN.

### 3.3.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der DNA-Lösung wurde durch Extinktionsmessung im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Dazu wurden 2 bis 4 µl der DNA-Lösung mit destilliertem Wasser auf das Endvolumen von 50 µl gebracht und in Quarzküvetten vermessen. Der Quotient aus den bei 260 nm und 280 nm unter Berücksichtigung des Leerwertes gemessenen Werten ( $OD_{260} / OD_{280}$ ) erlaubt eine Beurteilung der Reinheit der Probenlösung. Werte des Quotienten von  $\geq 1,8$  sind bei guten Präparationen zu erwarten.

Eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Menge von 50 µg doppelsträngiger DNA.

Konzentrationsberechnung:  $c = OD_{260} * e_{DNA} * V$

c - Konzentration der Nukleinsäurelösung ( µg/µl)

$OD_{260}$  - Extinktion bei 260 nm

$e_{DNA}$  - Extinktionskoeffizient von Nukleinsäuren ( 0,05 cm<sup>2</sup> / mol )

V - Verdünnungsfaktor

### 3.4 PCR und Verdau

#### 3.4.1 PCR-Version I: Nested-PCR

Die primär durchgeführte „nested- PCR“ setzte sich entsprechend den Arbeiten von Levi und Kahn aus zwei PCRs (PCR1 und PCR2) mit je einem anschließenden Restriktionsenzymverdau zusammen.

Zuerst wurde die DNA mit einem Primerpaar für das Exon I des Ki-Ras-Gens amplifiziert, dabei wurden (wie unter 1.4. erläutert - siehe Abbildung 4) „mismatch“-Primerpaare verwendet. Der antisense-Primer 2a trägt einen „mismatch“- Cytosin Rest an der ersten Position des Codon 11, dadurch wird die Schnittstelle – CCTGG - für das Restriktionsenzym BstN I geschaffen, die die ersten zwei Nukleotide des Codon 12 einschließt. Liegt eine Ras-Mutation vor, entsteht nach Amplifizierung keine Schnittstelle. Demnach liegen nach der ersten PCR und dem ersten Enzymverdau zwei Fragmente unterschiedlicher Länge vor.

In der zweiten PCR werden selektiv die Mutanten vervielfältigt, dazu wird derselbe sense-Primer 1s und ein anderer antisense-Primer 3a eingesetzt. Das PCR-Produkt wird wiederum mit BstN I verdaut.

<b>PCR-Ansatz : PCR-Version I</b>		
	<b>PCR 1</b>	<b>PCR 2</b>
PCR-Puffer	5 µl	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2 µl	2µl
d NTP (2,5 mM)	2 µl	2 µl
Primer 1 s (50 pM)	1 µl	1 µl
Primer 2 a (50 pM)	1 µl	-
Primer 3 a (50 pM)	-	1 µl
DNA / Verdauprodukt	△ 1µg	1 µl
Taq-Polymerase (1:5)	1 µ	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50µl	ad 50µl

### Oligonukleotidsequenzen der Primer:

Upper-Primer ( sense):

Primer 1s : 5'- ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT -3'

Lower Primer (antisense):

Primer 2a : 5'- TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC-3'

Primer 3a : 5'- TAA TAT GTC GAC TAA AAC AAG ATT TAC CTC-3'

Zur Durchführung der PCR wurden auf Eis die Komponenten des sog. Prä-Mixes (H<sub>2</sub>O, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, PCR-Puffer, Primer) vorgelegt, in sterile, dünnwandige 500µl Reaktionsgefäße verteilt und das entsprechende Volumen der DNA-Lösung für jede Probe zupipettiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe von je 1 µl Taq-Polymerase (Firma Gibco BRL).

Um Verdunstung zu vermeiden, wurde jeder Reaktionsansatz mit 50 µl Mineralöl überschichtet.

PCR-Zyklen:			
	Temperatur	Zeit	Zyklus
Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	1 - 25
Annealing	55 °C	1 min	
Extension	73 °C	1 min	
Extension	73 °C	5 min	

Die erste PCR wurde nach angegebenem Profil durchgeführt, die Proben wurden anschließend abgekühlt und bei 4 °C gelagert. Für langfristige Aufbewahrung wurden die PCR-Produkte bei – 20 °C eingefroren.

Nach Verdau mit BstN I zu den unter 3.4.2. angegebenen Bedingungen wurde je 1 µl aus dem Verdau-Produkt als Template der zweiten PCR eingesetzt. Als Primer dienten 1 s und 3 a, die übrigen Komponenten entsprachen denen der ersten PCR. Die zweite PCR durchlief bei gleichem Profil (siehe Schema) im Gegensatz zur ersten PCR 30 Zyklen.



Das endgültige PCR-Produkt wurde wiederum mit BstN I verdaut und mittels Gelelektrophorese analysiert (siehe 3.5).

Da die PCR ein hochsensibles Verfahren darstellt, und die Kontaminationsgefahr bei der nested-PCR besonders zu beachten ist, war äußerst sorgfältiges Vorgehen erforderlich.

In der Durchführung wurde mit sterilen Filtertipps (gestopfte Einmalspitzen), getrennten Pipetten- und -spitzensätzen, teilweise auch unter der Sterilbank gearbeitet. Zusätzlich wurden die PCR-Ansätze in von den anderen Schritten getrennten Räumen durchgeführt und entsprechende Kontrollansätze (3.4.4) gemacht.

### 3.4.2 Enzymverdau und RFLP

In der ersten PCR führten wir durch den mismatch-Primer im unmutierten Codon eine Schnittstelle für das Enzym BstN I ein: 5' ...CCTGG...3'. Der anschließende Restriktionsenzymverdau produzierte abhängig vom Vorliegen der Mutation im K-Ras-Gen PCR-Produkte unterschiedlicher Länge. In der zweiten PCR wurden selektiv die Mutanten vervielfältigt, ein zweiter Verdau sollte alle noch entstandenen Wildtypen schneiden. Da so nach dem Verdau DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge vorliegen (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus = RFLP), wird eine Analyse durch Gelelektrophorese möglich.

Dem PCR-Produkt wurden 10,5 µl der Puffer-Lösung für den Verdau und 0,5µl BstN1 (Firma New England Biolabs) zugegeben. Bei 60 °C, der optimalen Arbeitstemperatur für das hitzestabile Enzym, erfolgte der Verdau für eine Stunde im Wasserbad.

<b>Verdau-Ansatz:</b>	
NaCl (2 M)	2,5 µl
BSA	2,5 µl
DTT	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	5 µl
<b>BstN I</b>	0,5 µl

### 3.4.3 PCR-Version II: Zwischenstufen und Endversion

Die hohe Rate an falsch positiven Ergebnissen mit der nested PCR Version I machte Umstellungen zur Reduktion der Fehlerrate, speziell zur Erhöhung der Kopiergenauigkeit der Taq-Polymerase nötig, insbesondere, da ein Wechsel des Enzyms aus den unter 4.2.2.2 aufgeführten Gründen nicht möglich war.

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden v.a. die Konzentrationen wichtiger PCR-Komponenten variiert und Reihenansätze bzw. Gradienten-PCRs zur Verbesserung des Temperaturprofils durchgeführt.

Die Austestung der besten Konzentration für die dNTPs und die Magnesiumionen sowie die Ermittlung des optimalen Temperaturprofils erbrachten ein neues PCR-Schema. Außerdem hatte sich in Versuchen zur Primervariation gezeigt, daß die Verwendung von nur zwei Primern (1s und 3a) gleich gute Ergebnisse brachte, d.h. gleiche Sensitivität und Spezifität.

Der Zusatz von BstN I zum PCR-Ansatz verringerte durch Schneiden des Wildtyps im Verlauf der Amplifizierung die Rate an unverdaulichem Wildtyp im Endprodukt und damit die Menge an falsch positiven Resultaten im Gel. Anfangs setzten wir 1 µl des hitzestabilen Enzyms pro PCR-Reaktion ein.

Um die geeignete Kombination der Zyklenanzahl zur Steigerung der Sensitivität zu finden, variierten wir diese in mehreren Ansätzen. Prinzipiell sollte die Zyklenzahl der ersten PCR eher niedrig gehalten werden, um eine exponentielle Vermehrung „falscher“ Produkte in der zweiten PCR zu vermeiden. Da bei 12 Zyklen der ersten und 28 Zyklen der zweiten PCR die Resultate nicht zufriedenstellend waren, erhöhten wir auf die angegebenen 25 und 40 Zyklen.

So entstand zuerst folgender PCR-Ansatz :

PCR-Ansatz :	
Reaktionsvolumen:	50 µl
d NTP	40 µM
Primer 1 s	0,5 µM
Primer 3 a	0,5 µM
PCR-Puffer	5 µl
DNA	1 µg
Polymerase (Red-Taq)	2,5 units
BstN1	1 µl
im PCR-Puffer:	
MgCl <sub>2</sub>	0,11 mM

PCR-Zyklen:				
	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklus</b>	
Denaturierung	92 °C	2 min	PCR1	PCR2
Denaturierung	92 °C	15 sec	1 – 25	1 - 40
Annealing	55 °C	5 sec		
Extension	64 °C	1 min		
Extension	64 °C	4 min		

Im weiteren Verlauf setzten wir das Restriktionsenzym BstN I in höherer Konzentration in den PCR-Ansatz ein. Da so fast sämtlicher Wildtyp bereits direkt nach der Entstehung im Verlauf der PCR gespalten wurde und dann nicht mehr als Matrize der weiteren Amplifizierung zur Verfügung stand, konnte die Verdau-PCR über 45 Zyklen durchgeführt werden. Es gelang eine selektive Anreicherung mutierter Sequenzen und die Methode erreichte eine hohe Sensitivität. Dazu trug auch eine Reduktion der Primerkonzentration bei, die wiederum durch mehrfache Variation der Versuchsansätze ermittelt worden war.

PCR-Ansatz : PCR-Version II (45 Zyklen)	
Reaktionsvolumen:	50 µl
d NTP ( 40 µM)	1 µl
Primer 1 s	0,25 µl
Primer 3 a	0,25 µl
PCR-Puffer	5 µl
BstN I	2 µl
Red-Taq	2,5 µl
DNA	1 µg
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Durch den Einsatz von BstN I in der PCR hatte sich gezeigt, daß das Enzym im Reaktionsansatz ohne Vorlage eines spezifischen Puffers gut schneidet – zumal die Bedingungen sehr ähnlich sind. Daher wurde im Endverdau kein BstN I-Puffer mehr verwendet und zur Verringerung des Enzymverbrauchs nur die zur Gelanalyse nötige Menge verdaut.

Verdau : Version II – 1 h – 60 °C	
PCR-Produkt	20 µl
<b>BstN I</b>	2 µl

#### 3.4.4 Kontaminationskontrollen

Die PCR leistet eine exponentielle Vervielfältigung der Matrize, d.h., es besteht die Gefahr einer Potenzierung von „Fehlkopien“ – insbesondere, wenn diese im Verlauf der ersten Amplifikationsrunden entstehen. Daher müssen Verunreinigungen von Reagenzien und Materialien mit PCR-Produkten unbedingt vermieden werden.

Wir trennten daher DNA-Präparation, PCR-Ansatz und Analyse der PCR-Produkte räumlich und arbeiteten unter Berücksichtigung der entsprechenden Maßregeln (siehe 3.4.1)

Zur Kontrolle wurden bei jedem Ansatz Negativkontrollen mitgeführt. Zum Ausschluß der Verunreinigung von Reagenzien diente die Wasserprobe, d.h. anstelle der Matrize wurde Wasser eingesetzt. Bei jedem Ansatz wurden Proben gesunder Probanden bzw. Ras-negativer Zelllinien (3.2.4) mituntersucht.

### 3.5 Gelanalyse und Gelextraktion

Aufgrund ihrer negativen Ladung trennen sich DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht voneinander.

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente eignen sich Agarose- und Polyacrylamid-Gele. Standard-Agarose-Gele zwischen 0,5% und 1,8% trennen Fragmente zwischen 0,2 und 30 kb, hochprozentige Agarosegele und Polyacrylamid-Gele sind zur Analyse bei Längen unter 200 bp geeignet.

Als Laufpuffer kann sowohl 1 x TBE als auch 1 x TAE verwendet werden, wobei TAE-Puffer für präparative Gele bevorzugt wird, während TBE-Puffer schärfere Banden erzeugt und daher für hochauflösende Gele zu wählen ist.

Materialien:

#### 10 x TBE - Puffer

Tris 108 g  
Borsäure 55 g  
EDTA (0,5M,pH 8,0)4,0 ml  
H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

#### 50 x TAE - Puffer

Tris pH 8,240 mM  
EDTA 2 mM  
Essigsäure20 mM

#### 3.5.1 Verwendete Gele, Loading-Buffer und DNA-Marker

##### 3.5.1.1 Polyacrylamidgele

Zur Analyse unserer PCR-Produkte mit einer Länge zwischen 120 und 140 Basenpaaren verwendeten wir 12 % Polyacrylamidgele. Die Gelmasse wurde aus Acrylamid, Aqua dest. und Tris-Bohr-EDTA-Puffer (siehe 3.5) hergestellt; nach dem Vermengen dieser Substanzen leitete die Zugabe von 100 µl Ammoniumpersulfat (25%) und 50 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) die Polymerisation

ein. Daher sollte die Gellösung baldmöglichst in die vorbereiteten Gelkammern gegossen werden.

Die komplette Polymerisierung bei Raumtemperatur dauerte zwischen 2 und 3 h.

<b>PAA-Gel:</b>	
Acrylamid (30 %)	16,6 ml
TBE (10 fach)	5 ml
H <sub>2</sub> O	28,3 ml
Start der Polymerisation durch Zugabe von :	
APS (25 %)	100 µl
TEMED	50 µl

### 3.5.1.2 Agarosegele

Bei einer Fragmentlänge < 200 bp benötigten wir hochprozentige Agarosegele. Die eigene Herstellung kann bei diesen Konzentrationen problematisch sein und zu inhomogenen Gelen führen. Es wurden daher 4 % Fertiggele und sog. E-Gele der Firma Invitrogen verwendet.

### 3.5.1.3 Loading-Buffer und DNA-Marker

Der zum Sichtbarmachen der Front der PCR-Produkte während der Gelanalyse verwendete Loadingbuffer enthält die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol. Er wurde den PCR-Produkten vor dem Auftragen aufs Gel zugegeben und ermöglichte eine Kontrolle des Elektrophoreselaufs.

Zum Größenvergleich der Fragmente dienten DNA-Längenstandards (25 bp DNA Ladder; Firma Gibco BRL).

Materialien:

**Loading-Puffer:**

Glycerol (50% ig)

1 mM EDTA

0,4% Bromphenolblau

0,4% Xylencyanol

**Ammoniumpersulfat 25 %:**

APS 0,25 g

H<sub>2</sub>O ad 1 ml

3.5.2 Gelanalyse der PCR-Produkte:

Die auspolymerisierten **Polyacrylamidgele** wurden zur vertikalen Elektrophorese in der zugehörigen Elektrophoresekammer eingespannt und die Gelzwischenräume sowie die Wannens der Kammer mit TBE-Puffer aufgefüllt. Die Trennstrecke betrug 15 cm, die Geldicke 0,75 mm. Vor dem Auftragen gaben wir 1/6 des Volumens an Loading-Puffer zu den Proben.

Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung mit 1 bis 8 V pro cm Gellänge. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Bromphenolbande die untere Pufferkammer erreicht hatte.

Das „Sichtbarmachen“ der DNA geschah durch anschließende Färbung der Gele in separaten Gefäßen in einer Lösung von 50 µl Ethidiumbromid auf circa 25 ml Aqua dest. für mindestens 15 min. Die Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren mit der DNA-Helix; im UV-Licht einer Wellenlänge von 302nm wird die Fluoreszenz der DNA-Ethidiumbromidkomplexe angeregt und so die DNA sichtbar. Es sollte eine Kontrolle unter UV-Licht erfolgen, um eine „Überfärbung“ zu vermeiden. Eine anschließende 2 bis 3 malige Spülung mit Aqua dest. entfernt überschüssiges Ethidiumbromid.

Die Analyse in den sog. **E-Gelen** erfolgte in der zugehörigen Kammer der Firma Invitrogen, die Zugabe eines Elektrophoresepuffers war nicht nötig, auch das zur DNA-Färbung nötige Ethidiumbromid war in diesen Gelen bereits enthalten. Nach Anschluß des Systems an Haushaltsstrom betrug die Laufzeit 30 Minuten.

Die **Agarosegele** schwammen in einer mit 1xTAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer. Nach Zugabe von 400–500 µl Ethidiumbromidstammlösung auf circa 2 l Puffer erfolgte bereits während der horizontalen Elektrophorese die Anfärbung der DNA durch Interkalierung des Ethidiumbromids zwischen die Basen.

Nach entsprechender Vorbereitung der Gele wurden die mit Loading-Buffer in einem Verhältnis von 2:10 gemischten PCR-Produkte in die Geltaschen vorsichtig einpipettiert.

Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 1 bis 5 V pro cm (Abstand zwischen den Elektroden der Kammer).

Aufgrund der „Anfärbung“ der Fragmente in den mit Ethidiumbromid-behandelten Gelen bereits während der Elektrophorese war eine Kontrolle der erfolgten Laufstrecken unter UV-Licht zwischenzeitlich möglich. Ansonsten mußte die Orientierung indirekt an der Front des Loading-Buffers erfolgen.

Die Gele wurden vorsichtig aus den Elektrophoresekammern bzw. den Färbewannen genommen und auf einen Leuchttisch (Bachhofer) gelegt. Zur Bilddokumentation wurden Polaroidphotos angefertigt. Sollte eine weitere Analyse der Mutationsbanden erfolgen, wurden die jeweiligen Banden zuerst unter UV-Licht mit sterilen Skalpelln inzidiert. Dabei wurde für jedes Fragment ein eigenes Skalpell verwendet, um Kontaminationen zu vermeiden.

Neben den Mutationsbanden der Patientenproben wurden auch mehrfach Negativkontrollen, d.h. die Banden des Wildtyps, mit ausgeschnitten und weiterverarbeitet.

Die markierten Gelstückchen wurden dann komplett ausgestochen, in sterile 2ml Tubes gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 °C eingefroren.

### 3.5.3 Gelextraktion der PCR-Produkte

Nach Ausschneiden der entsprechenden Banden aus den Gelen, wurden die Proben bei – 20 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Die DNA-Isolation aus den Gelstückchen wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Methode bedient sich der selektiven DNA-Bindung an Silicagelmembranen nach Auflösung der Gelsubstanz.



### 3.6 Klonierung der PCR – Produkte

#### 3.6.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Eine bestmögliche Vorbereitung der PCR-Produkte für Ligation und Klonierung sollte eine hohe Transformationsfrequenz ermöglichen.

Die PCR-Endprodukte wurden bei 4 °C bzw. – 20 °C gelagert, die Proben wurden auf Raumtemperatur gebracht und mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach den Vorgaben des Herstellers soweit möglich von Resten der PCR-Komponenten befreit. Eine erneute Gelelektrophorese wurde zur weiteren Aufreinigung durchgeführt. Die zu analysierenden Banden wurden wiederum ausgeschnitten und die DNA-Fragmente mittels Gelelution gewonnen.

Für die nachfolgende Ligation war eine Konzentration der DNA von circa 0,5 µg/ml erforderlich, daher wurde bei Unterschreiten dieser Konzentration eine Fällung mit der Fällungshilfe Pellet Paint (Firma Novagen) durchgeführt.

Materialien:

Fällung:	Gel-Eluat	ca. 150 µl
	Pellet Paint	2 µl
	Natrium-Acetat	15 µl
	Ethanol abs.	ca. 350 µl

#### 3.6.2 Präparation der DNA-Enden

Die Präparation der DNA-Enden führten wir bei Verwendung des Perfectly Blunt Cloning Kit der Firma Novagen durch die „End Conversion“ durch. Dabei entstehen glatte, phosphorylierte DNA-Enden. Der Ansatz für die Veränderung der Enden wurde gemischt und 15 min bei 22 °C inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 75 °C für 5 min gestoppt. Der Ansatz mußte dann rasch auf Eis gekühlt werden, um eine Inaktivierung der Ligase im nächsten Schritt zu verhindern. Die Proben wurden aufgrund der Kondensatbildung abzentrifugiert und dann zur Ligation eingesetzt.

Ansatz - End Conversion:	
PCR-Produkt	2 $\mu$ l ( 0,050 pmol)
End conversion mix	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ l

### 3.6.3 Ligation mit dem T 4 – Vektor

Nach der „End Conversion“ liegen die DNA-Fragmente in phosphorylierter Form mit glatten Enden vor. Daher können sie durch die T 4- DNA- Ligase an einen Vektor mit glatten, dephosphorylierten Enden gebunden werden. Wir verwendeten den Vektor pT7 Blue der Firma Novagen (siehe Abbildung 5).

Ligationsansatz:	
„Blunt“ Vektor (pT7Blue; 50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
DNA ( End Conversion Mix)	10 $\mu$ l
T 4 DNA-Ligase ( 4 units)	1 $\mu$ l
Eco R V	0,2 $\mu$ l

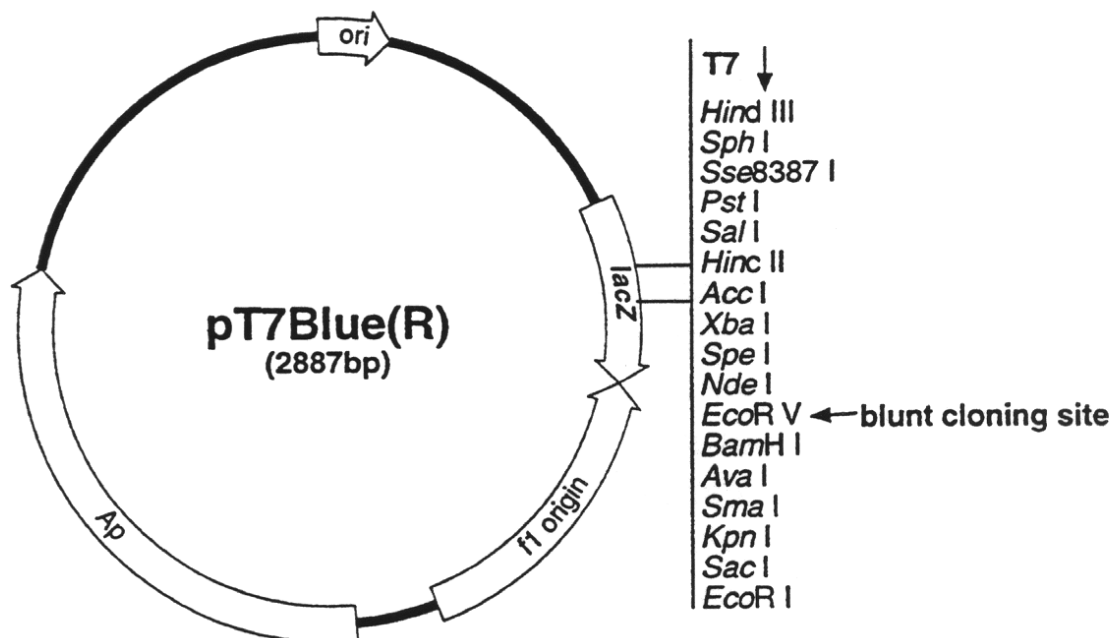


Abbildung 5: Vektorkarte pT7 Blue der Firma Novagen

Ap: Ampizillin-Resistenz-Gen – zur Selektion transformierter Bakterien

ori: „origin of replication“ – ermöglicht die Replikation in E.coli

lacZ- Gen: ermöglicht Blau/Weiß-Selektion

Blunt cloning site – hier erfolgt das Einklonieren der Fremd-DNA

Zur Ligation wurden die PCR-Fragmente mit den glatten Enden und der Vektor gemischt, zuletzt erfolgte die Zugabe der Ligase. Nach 15 minütiger „Vorligation“ bei Raumtemperatur wurden pro Reaktion 0,2µl des Restriktionsenzym EcoR V einpipettiert. Die abschließende Ligation dauerte 2 h bei 22 °C.

#### 3.6.4 Transformation kompetenter E.coli

Zur Transformation verwendeten wir E.coli der Firma Novagen, die bereits als kompetente Bakterien geliefert wurden. D.h., sie wurden derart präpariert, daß sie spontan Fremd-DNA aufnehmen können. Die Einschleusung des Vektors in diese „Nova Blue Singles“ wurde nach der Hitzeschockmethode gemäß den Vorschriften des Klonierungskits durchgeführt:

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und je 1 µl des Ligationsansatzes vorsichtig mit der Pipettenspitze eingerührt. Die Reaktionsgefäße mussten anschließend sofort wieder für 5 min auf Eis gestellt werden. Dann wurden die Bakterien für genau 30 sec im Wasserbad bei genau 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach Abkühlen auf Eis für 2 min wurden je 250 µl SOC-Medium (Raumtemperatur) zugegeben und die Bakterien bei 37 °C für 30 min unter Schütteln kultiviert. In dieser Zeit wurde das Ampicillin-Resistenz-Gen exprimiert, so daß der Transformationsansatz (je 10 und 90 µl) zur Selektion auf ampicillinhaltige LB Platten mit IPTG /X-Gal ausgestrichen werden konnte.

#### 3.6.5 Bakterienkultivierung

##### 3.6.5.1 Kulturbedingungen und Konservierung

Aerobe Kultivierung bei 37 °C in den entsprechenden Kulturmedien bietet den E.coli optimale Wachstumsbedingungen. Die Flüssigkulturen wurden zusätzlich in sterilen Plastikröhrchen mit 200 rpm bewegt.

Direkt nach der Transformation wurden die Bakterien in SOC-Medium angezüchtet, welches im Kloning Kit der Firma Novagen in entsprechender Zusammensetzung enthalten war.

Das Wachstum von Einzelklonen erfolgte dann auf Agarplatten. Dazu lösten wir 15 g LB-Agar in destilliertem Wasser und fügten nach dem Autoklavieren neben Ampicillin (Endkonzentration 100 mg/ml) noch IPTG und X-Gal zu, Möglichkeit der „Blau-Weiß-Selektion“ zu nutzen. Im Wasserbad wurde die Lösung auf 60 °C abgekühlt und in keimarme Petrischalen gegossen.

Zur weiteren Kultivierung der E.coli verwendeten wir das Nährmedium Luria-Bertani (LB).

Das Medium wurde nach Ansetzen (10 g in 500 ml Aqua dest.) für 15 min bei 121 °C und 1 bar autoklaviert, nicht autoklavierbare Bestandteile wurden steriltfiltriert und anschließend dem Medium zugesetzt.

Der Zusatz von Ampicillin – nach dem Autoklavieren - in einer Endkonzentration von 100 µg/ml ermöglichte die Selektion transformierter, plasmidhaltiger Bakterien.

Agarplatten und Medium wurden, mit Deckel und Paraffinfilm verschlossen, bei 4 °C gelagert.

#### **Konservierung:**

Zur Aufbewahrung der Bakterien über einen längeren Zeitraum legten wir Glycerinkulturen an. Glycerin erlaubt eine langfristige Lagerung bei – 80 °C ohne Vitalitätsverlust der Bakterien.

Dazu wurden je 500 µl einer Über-Nacht-Kultur in LB-Ampizillin-Medium (Sättigungsphase) sorgfältig mit 400 µl sterilem Glycerin vermischt.

Zum Anzüchten aus Glycerinkulturen wurde ein kleiner Teil mit einer sterilen Impföse entnommen und in Nährmedium überführt oder auf einer Agarplatte ausgestrichen.

#### 3.6.5.2 Selektion und Charakterisierung von Einzelklonen

Nach der Transformation wurden die Bakterien zuerst 30 min in SOC-Medium kultiviert, in dieser Zeit wird das Ampizillin-Resistenz-Gen exprimiert. Nach Ausplattieren auf ampizillin- und IPTG- und X-Gal-haltige Agarplatten kommt es zu einem selektiven Wachstum der plasmidhaltigen E. coli.

Aufgrund der Blau-Weiß-Selektion durch IPTG und X-Gal können nach ca. 24 h weiße Einzelklone entnommen (gepickt) werden. Pro Transformationsansatz wurden ca. 4 Einzelklone mit sterilen Impfösen erneut auf Agarplatten ausgestrichen.

Nach wiederum ca. 24 h werden erneut Einzelklone gepickt und je eine Flüssigkultur durch Einimpfen in Nährmedium angesetzt. Unter Schütteln bei 200 rpm und Luftzufuhr vermehrten sich die Bakterien über 12 bis 16 h bei 37 °C.

Die Zelldichte der Bakterien kann durch photometrische Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt werden. Das entsprechende Medium dient als Referenzlösung. Eine OD<sub>600</sub> von 1,0 entspricht einer Zelldichte von 10<sup>9</sup> Bakterien / ml.

Ist die Bakteriendichte der Flüssigkultur ausreichend, wird die Lösung in sterile Reaktionsgefäße überführt und für 2 min bei 10 000g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet zur Plasmidpräparation bei – 20 °C eingefroren.

Um frühzeitig eine gezielte Weiterzüchtung derjenigen Bakterien zu gewährleisten, die genau das interessierende PCR-Fragment enthalten, wurde über die bereits erwähnten Selektionsmechanismen hinaus eine Bakterien-PCR zur weiteren Charakterisierung durchgeführt .

Dazu wurden mit sterilen Holzstäbchen gepickte Einzelklone direkt in die Reaktionsgefäße gestrichen. Entweder fügten wir ca. 50 µl Aqua dest. hinzu und setzten nach Aufkochen der Suspension und Abzentrifugieren den Überstand in die PCR ein, oder wir gaben den PCR-Mix direkt auf die Bakterien im Reaktionsgefäß und starteten die Amplifizierung.

Wir verwendeten zur Charakterisierung der Klone die Primer 1 s und 3a der Ras-PCR, auch die Reaktionsbedingungen wurden beibehalten (siehe 3.4.3). Die Analyse durch Gelelektrophorese zeigte, ob der Bakterienklon das Fragment mit der Ras-Mutation enthielt.

### **3.7 Plasmidpräparation**

Bakterienklone, die laut Bakterien-PCR oder Restriktionsanalyse das gewünschte Insert trugen, wurden in präparativem Maßstab kultiviert. Die Isolation der Plasmid-DNA führten wir mit dem QIAquick Spin Mini Prep Kit der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers durch.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektralphotometrisch.

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Plasmide bei – 20 °C eingefroren, ansonsten bei 4 °C gelagert.

### **3.8 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzanalysen**

Die Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente wurde kommerziell von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Diese arbeitet mittels Cycle-Sequenzierung mit <sup>33</sup>P markierten Primern nach dem Didesoxynukleotidverfahren nach Sanger.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem DNA-Analyseprogramm DNAsis des HIBIO-Programmpakets. Zum Auffinden von Sequenzhomologien wurden mit Hilfe des Algorithmus „BLASTn“ die Sequenzdatenbanken des EMBL („European Molecular Biology Laboratories“ in Heidelberg) durchsucht.

## 4 Ergebnisse:

### 4.1 Methode I : Mismatch-PCR Version1 und Enzymverdau

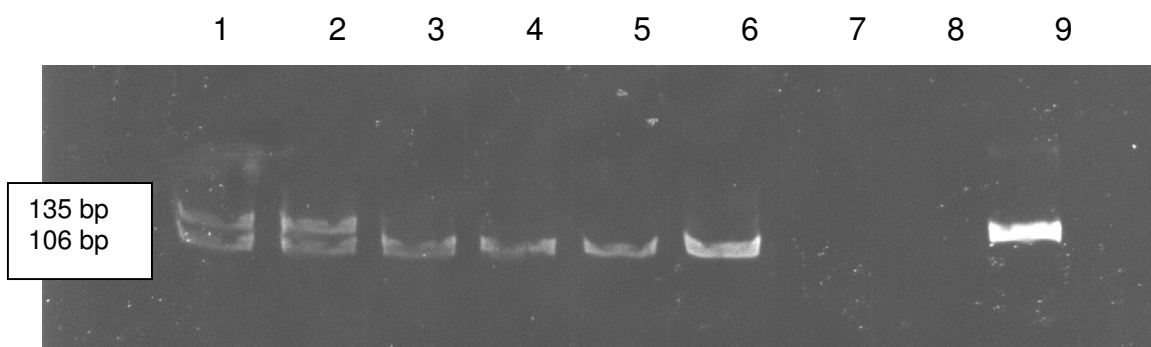
#### 4.1.1 Etablierung der Mismatch-PCR „Version1“ und Ermittlung der Sensitivität

Zu Beginn der Studie wurde die Methodik der Mismatch-PCR, wie sie von Levi et al. 1991 beschrieben worden war, in unserem Labor etabliert und ihre Sensitivität überprüft.

Dazu wurden Verdünnungsreihen von Karzinomzellen der Zelllinie SW 480 im Vollblut gesunder Probanden hergestellt. Nach Präparation der DNA in angegebener Weise wurde die entsprechende DNA-Menge als Template der Mismatch-PCR Version 1 eingesetzt. Nach den beiden PCRs mit jeweils anschließendem Verdau zeigte die Analyse durch Gelelektrophorese, daß sich die Mutationsbande bis zu Verdünnungen von  $1:10^4$ , teils sogar bis  $1:10^6$  nachweisen ließ.

Diese Ergebnisse waren trotz vielfacher Ansätze und sämtlicher Maßnahmen zum Ausschluß von Kontaminationen nur eingeschränkt reproduzierbar.

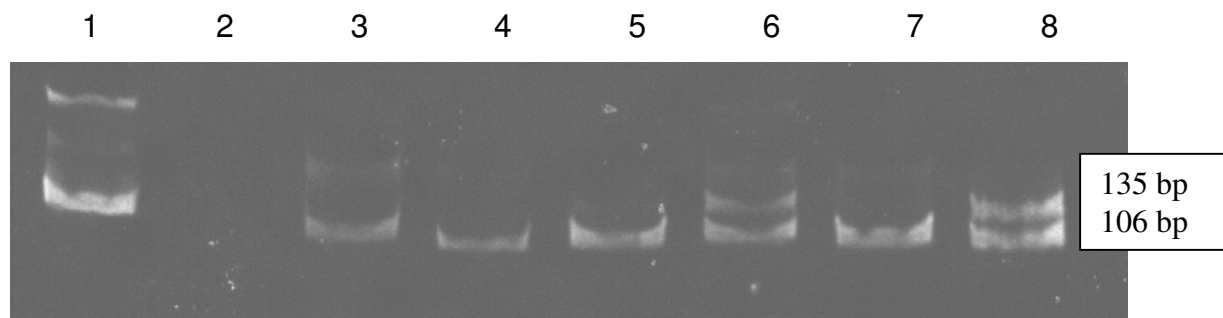
Abbildung 6 : Verdünnungsreihen von SW 480 im Blut gesunder Probanden



#### Reihe 1:

Bahn 1:  $1:10^3$ ; Bahn 2:  $1:10^4$ ; Bahn 3:  $1:10^5$ ; Bahn 4:  $1:10^6$ ; Bahn 5:  $1:10^7$ ;

Bahn 6: Wildtyp, Bahn 7: H<sub>2</sub>O; Bahn 8: leer; Bahn 9: SW 480



### Reihe 2:

Bahn 1: SW 480; Bahn 2: H<sub>2</sub>O; Bahn 3: Wildtyp; Bahn 4: 1:10<sup>7</sup>; Bahn 5: 1:2x10<sup>6</sup>;  
 Bahn 6: 1:10<sup>6</sup>; Bahn 7: 1:10<sup>5</sup>; Bahn 8: 1:20 000

Untersuchungen der DNA aus Kontrollzelllinien, aus dem Blut von Tumorpatienten, sowie aus dem Blut gesunder Probanden nach dieser Methode folgten.

In den bis zu dieser Zeit aufgearbeiteten 37 Blutproben von Patienten mit histologisch gesichertem Pankreaskarzinom fanden sich in 81% der Fälle (= 30 Proben) Ras-Mutationen. Im Verlauf der Erkrankung wurden 2 der 7 anfangs Ras-negativen Patienten positiv. Bei Wiederholung der Untersuchungen an neuen Blutproben war bei 4 der anfangs positiven Patienten keine Ras-Mutation mehr nachweisbar; es bleibt fraglich, ob dies als ein Effekt unter laufender Chemotherapie zu werten ist.

Die Proben von 6 gesunden Probanden zeigten keine Mutation. Ein Patient mit chronischer Pankreatitis wies eine schwache Mutationsbande auf.

Bei jedem PCR-Ansatz wurde DNA aus dem Blut gesunder Probanden und definierter Zelllinien als Negativ-, und DNA aus bekanntermaßen mutierten Tumorzelllinien (3.2.4) als Positivkontrolle mitgeführt; die Wasserprobe diente zum Ausschluß von Kontamination durch Verunreinigung der Reagenzien.

Die Kontaminationskontrollen blieben stets negativ, die Tumorzelllinien zeigten regelmäßig die erwartete Mutationsbande, doch bereits bei den ersten Reihenuntersuchungen zur Etablierung der Mismatch-PCR nach Version 1 fielen rezidivierend Mutationsbanden unter den Negativkontrollen auf. Auch traten bei Verwendung ein und derselben Ausgangs- DNA als Template unterschiedlicher

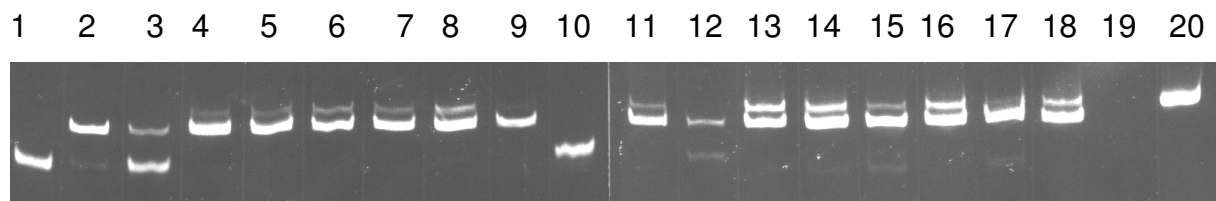


PCR-Ansätze die eigentlich nicht erwarteten Mutationsbanden ohne erkennbare Regelmäßigkeit auf.

#### 4.1.2 Modifikation des Enzym- Verdaus

Zur weiteren Klärung der sich mit dieser PCR-Methodik unerwartet darstellenden Mutationen wurden (nach wiederholtem Ausschluß von Kontamination mit den unter 3.4.4. aufgeführten Verfahren) Reihenuntersuchungen an Proben gesunder Probanden und Ras-negativer Zelllinien gemacht. Rezidivierend fanden sich Mutationen. Schloß man jedoch einen weiteren Verdau-Schritt des PCR-Endproduktes mit BstN I an, war bei vielen Proben die Ras- Mutation nicht mehr sichtbar oder die Mutationsbande in ihrer Stärke deutlich rückläufig.

Abbildung 7: Veränderung der PCR-Ergebnisse nach zusätzlichem Verdauvorgang  
- Reduktion der Mutationsbanden -



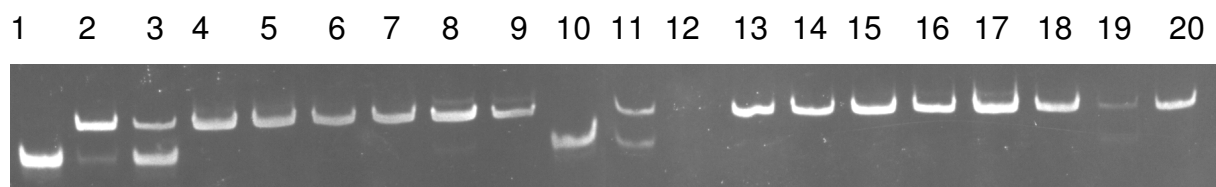
#### Resultat nach 1. BstN1-Verdau:

Bahn 3: HT 29; Bahn 10: H<sub>2</sub>O; Bahn 19: leer; Bahn 20: SW 480

Bahn 1 u. 2: Pankreassaft, V.a. Pankreas-Ca

Bahn 4 bis 9: Blut, Tumorpatienten

Bahn 11 bis 18: Blut, gesunde Probanden



#### Resultat nach zusätzlichem, 2. BstN1-Verdau ( identische Proben zu Verdau 1):

Bahn 3: HT 29; Bahn 10: H<sub>2</sub>O; Bahn 12: leer

Bahn 1 u. 2: Pankreassaft, V.a.Pankreas-Ca; Bahn 11: Pankreassaft, chron.Pankreatitis

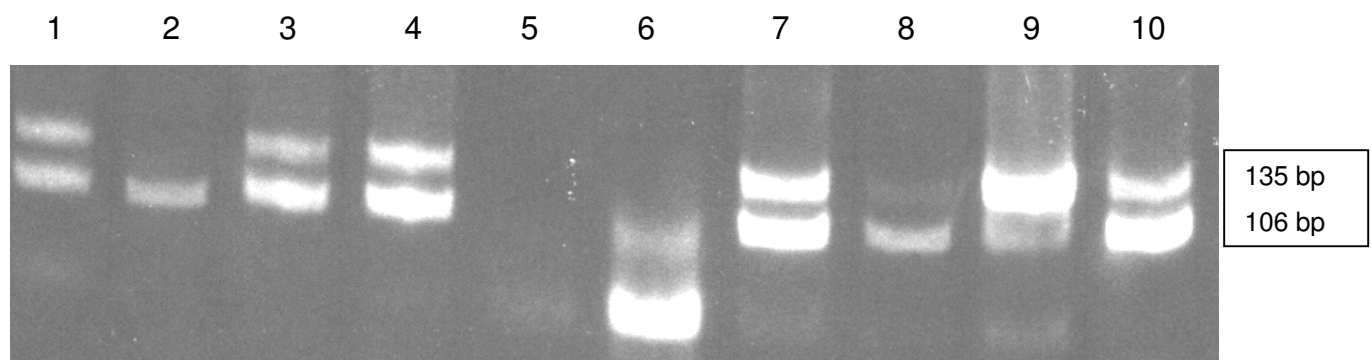
Bahn 4 bis 9: Blut, Tumorpatienten

Bahn 13 bis 20: Blut, gesunde Probanden

Daher wurde die ursprüngliche Verdauzeit verlängert ( siehe 3.4.2 ), um auch bei unproportional stark amplifiziertem Wildtyp ein vollständiges Zerschneiden durch das Enzym zu ermöglichen.

Im Anschluß wurde untersucht, ob bei den erheblich länger verdauten Proben durch Nachbehandlung mit teilweise auch erhöhter BstN I-Menge immer noch eine Änderung des Resultates zu erzielen wäre.

Abbildung 8: PCR-Resultat nach doppelter BstN1-Menge und Verdauzeit 7 h



Bahn 5 u. 6: H<sub>2</sub>O; Bahn 8 u. 9: Paraffinschnitt, Colonkarzinom

Bahn 1 bis 4, Bahn 7, Bahn 10: Blut, Colonkarzinom

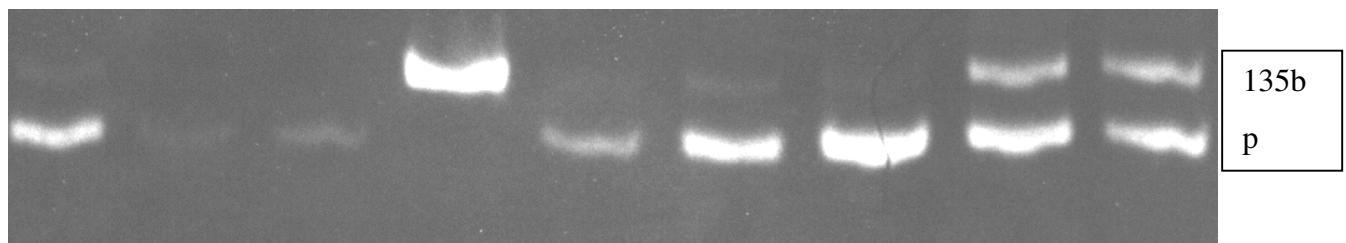
Um die Bedingungen für das Enzym weiter zu verbessern, wurde der Verdau auch nach dem Prinzip einer Hot-start-PCR angesetzt. Darüberhinaus reinigten wir in einem Parallelansatz zur Ausgangsmethode die PCR-Produkte vor dem BstN I-Verdau mit den QIAquick PCR- Reinigungssäulchen der Firma Quiagen, um eventuell den Verdau negativ beeinflussende Reagenzienreste zu entfernen. Die Ergebnisse blieben unverändert.

Ob es sich bei den jeweiligen „Mutationsbanden“ tatsächlich um mutiertes Ras oder um unverdauten Wildtyp handelte, sollte der Nachverdau der vermeintlichen Mutationsbande zeigen. Nach Ausschneiden und Elution aus dem Gel wurde erneut ein Verdau angesetzt. Während sich die Mutationsbanden von bekanntlich Ras-mutierten Proben und von DNA aus Tumorgewebe auch im Nachverdau als

veränderter Typ bestätigten, erwies sich bei einem Großteil der Negativkontrollen die vermeintliche Mutation als unverdauter Wildtyp.

Die DNA Ras-negativer Zelllinien behielt teils jedoch auch nach sorgfältigem Nachverdau ihre Mutationsbande, und auch die Ras-positiven Zelllinien zeigten keine konstanten Ergebnisse. Bei bekannten Daten über Veränderungen der genomischen Struktur bei Langzeit-Kultivierung immortalisierter Zellen konnte allerdings angesichts der vielen durchlaufenen Passagen derartige „Spontan-Mutationen“ als Ursache der nachweisbaren, bzw. nicht nachweisbaren Mutationsbande nicht ausgeschlossen werden.

Abbildung 9: PCR Zelllinien – Positiv – und Negativkontrolle



Bahn 1: HT 29; Bahn 4: SW 480

Bahn 5: HT 29 – andere Kultur als Bahn 1

Bahn 2 u. Bahn 3: Blut gesunder Probanden

Bahn 6 u. Bahn 7: Hep G2 – zwei verschiedene Zellreihen

Bahn 8 u. Bahn 9: Paraffinschnitte, Colonkarzinom

#### 4.1.3 Sequenzanalyse der Mutationen nach PCR Version 1

Auch die Maßnahmen, die ergriffen wurden, um die vermeintliche Fehlerquelle eines unvollständigen Enzymverdau zu beseitigen, konnten keine eindeutig reproduzierbaren Ergebnisse gewährleisten. Daher beschlossen wir zur weiteren Abklärung der Mutationsbanden der Negativ-Kontrollen bei genau diesen sowie einigen der bis dahin aufgearbeiteten Blut- und zugehörigen Gewebeproben eine Sequenzanalyse durchzuführen.

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Elution der Mutationsbande aus dem Gel und entsprechender Vorbereitung der Proben (siehe 3.6 ) erfolgte die Einklonierung in den Vektor und Transformation der kompetenten E. coli. Zeigte sich in Kontrollen der Einbau des richtigen Inserts, wurde nach entsprechender Vervielfältigung in Kulturmedien eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die Proben wurden weiter aufgearbeitet und zur kommerziellen Sequenzierung (GATC-Sequenzierservice) verschickt.

Insgesamt wurden zu diesem Zeitpunkt die Mutationen aus Blut- und Gewebeproben von 8 verschiedenen Patienten mit Colonkarzinomen analysiert. Bei 5 Patienten standen parallel Blut und Material des mutmaßlichen Primärtumors zur Verfügung, so daß ein direkter Sequenzvergleich möglich wurde. Dabei zeigte sich in nur einem Fall (Patient P.M.) eine exakte Übereinstimmung zwischen der Punktmutation im Primärtumor und der im Blut nachgewiesenen Veränderung. Ansonsten stellten wir sogar Differenzen zwischen den Mutationen der einzelnen Bakterienklone aus ein und derselben ursprünglichen Probe fest.

Die Analyse zweier Kulturen der Hepatomzellen HEP G2, erbachte einmal eine Deletion sowie einmal eine „Ras-Mutation“ in Form einer Punktmutation. (siehe Tabelle 1)

- Tabelle 1 –

Patient	Blutprobe	TU-Gewebe	Sequenz
S.H.	226-F		CCGTAG
		P 12	CCTGAT
		P 12-D	CCTAGT
R.X.		P 2-A	CCTAGT
Z.G.	30 D		CCTG-T
	30 G		CCTTGG
		P 1-2	CCTGAT
H.Y.		P 13-1	CCTGAT
		P 13-10	CCTAGT
I.R.	34-5		CCTAGT
		P 14-C	CCTGTT
P.M.	26..2		CCTGAT
		P 5-21	CCTGAT
S.M.	39-20		CCTAG
	39-21		CCTAG

		P 11-21	CCTGA
P.U.		P 4-3	CCTGAT
HEP G2			CCT-GT
HEP 1			CCTGTG

## 4.2 Entwicklung der Methode II: Modifikationen von PCR und Verdau

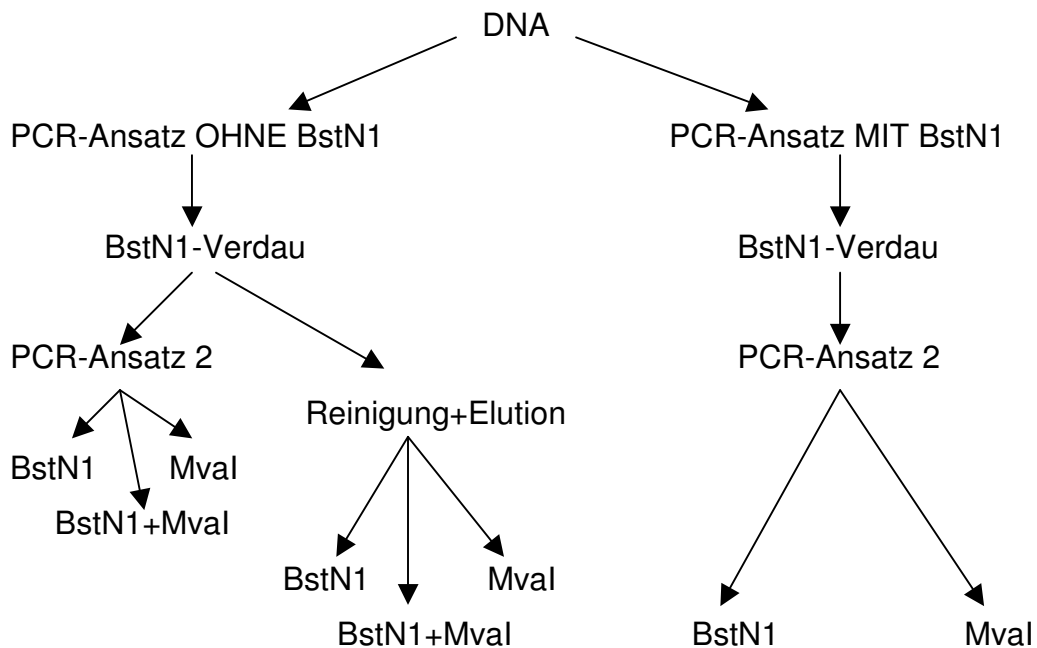
### 4.2.1 Einsatz des Restriktionsenzym während der PCR

Nachdem die Ergebnisse unserer Arbeiten wiederholt hohe Fehlerraten der aus der Literatur übernommenen Methoden aufdeckten, sollten schrittweise Modifikationen die Entwicklung eines validen Verfahrens ermöglichen.

Die primär entdeckte Fehlerquelle war der unvollständige Verdau durch das Restriktionsenzym BstN I, wodurch die Mutationsdetektion durch RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) unzuverlässig wurde.

Ungefähr zeitgleich erschien eine Arbeit über die „Restriktions-Verdau-PCR“ zur Analyse von Ras-Mutationen (Huber et al., 1998, S.593-595). Um die unterschiedlichen Varianten im Einsatz des Enzyms bereits während der PCR oder auch die Verwendung von anderen Restriktionsenzymen mit ebenfalls geeigneten Schnittstellen zu testen, wurde ein Ansatz mit parallel durchgeführten Methodenvarianten nach dem aufgeführten Schema durchgeführt.

Abbildung 10: Schema Verdau-Versuch



Insgesamt zeigten sich zwar zwischen den verschiedenen Armen des „Verdau-Versuchs“ diskrete Unterschiede, die optimale Vorgehensweise jedoch, Anteile von unverdaulichem Wildtyp im Endprodukt zu verhindern, zeichnete sich nicht eindeutig ab und „falsche“ Mutationsbanden waren weiterhin zu beobachten.

Kombinationen zwischen den Restriktionsenzymen BstN I und Mva I erforderten lediglich Kompromisse in der Wahl der optimalen Puffersysteme, bei sonst gleichbleibenden Resultaten.

In letzter Konsequenz zeigte der Versuch allerdings, daß der Einsatz von BstN I bereits während der PCR, wie er von Huber et al. beschrieben worden war, gut möglich ist und die Amplifikation des Wildtyps im Verlauf der PCR zumindest soweit bremst, daß weniger unmutierte Ras-Gene als Matrizen zur Verfügung stehen und somit die Raten an ungeschnittenem Wildtyp nach dem anschließenden Verdau kleiner ausfallen.

#### 4.2.2 Modifikation der PCR-Bedingungen

Bekanntermaßen gibt es eine ganze Reihe kritischer Parameter zur Optimierung eines PCR-Verfahrens. Diese wurden teilweise in Einzelversuchen, teils in

kombinierten Ansätzen verändert, um so die Bedingungen zu ermitteln, unter denen die hohe Fehlerrate der ursprünglichen „Mismatch-nested-PCR“ zu minimieren wäre.

#### 4.2.2.1 Temperaturprofil der PCR und Anzahl der Zyklen

In Gradienten-PCRs wurden die optimalen Temperaturen und Zeiten für die einzelnen PCR-Abschnitte innerhalb der sinnvollen Spannen ermittelt.

Für die Anlagerung der Primer (Annealing) stellte sich eine Temperatur von 55 °C, für die Verlängerung (Extension) eine Temperatur von 64 °C in unseren Untersuchungen als besonders günstig heraus.

Im Rahmen der Gradienten-PCRs sowie der Untersuchungen der Sensitivität wurde die Zyklusanzahl mehrfach variiert. Im Hinblick auf die mit steigender Zykluszahl wachsende Rate falsch positiver Ergebnisse konnten wir durch die Umstellung bei den verwendeten Primern, insbesondere durch das Verlassen der nested-PCR von ursprünglich insgesamt 25 + 35 Zyklen auf letztlich 45 Zyklen reduzieren (Programm 55). (siehe auch 4.2.3 und 3.4)

#### 4.2.2.2 Wahl der Polymerase

Wir verwendeten zu Beginn der Versuche die Taq –DNA-Polymerase der Firma Gibco BRL, eine rekombinante, hitzestabile DNA-Polymerase mit hoher Prozessivität.

Versuche mit der „Jump-Taq“ brachten keine besseren Ergebnisse bezüglich der Fehlerrate.

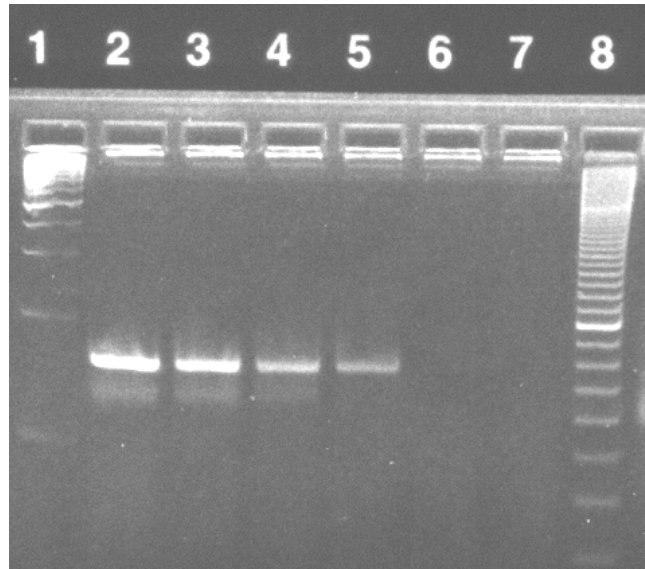
Die weiterhin verwendete Red-Taq der Firma Promega bietet bei gleichen Eigenschaften wie die Amplitaq den Vorteil einer Farbmarkierung, was das Handling erleichterte.

Bei der erforderlichen hohen Kopiergenauigkeit und damit zur Minimierung der Fehlerrate wäre eigentlich eine Proofreading-Polymerase das Enzym der ersten Wahl gewesen. Doch ihre 3'→5' Exonukleaseaktivität hätte den Einbau der Restriktionsenzymstrecke durch die Mismatch-Primer verhindert und somit die Untersuchungen unmöglich gemacht.

#### 4.2.2.3 Konzentration der Reagenzien

Variationen der Konzentration der Magnesiumionen erbrachten keine Verbesserung der PCR-Ausbeute, so daß sich letztendlich die vom PCR-Puffer gelieferte Magnesiummenge bei einer Konzentration von 11 mM Magnesiumchlorid als ausreichend darstellte.

Abbildung 11: Austestung der optimalen dNTP – und Mg-Konzentration



Bahn 1: DNA-Leiter, Bahn 8: DNA-Leiter

	MgCl <sub>2</sub> (mM)	dNTP (μM)
Bahn 2:	1,1	40
Bahn 3:	1,1	30
Bahn 4:	1,1	20
Bahn 5:	0,88	40
Bahn 6:	0,66	40
Bahn 7:	0,44	40

In mehreren Versuchen wurde die optimale dNTP-Menge insbesondere auch in Kombination mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen ausgetestet; die besten Ergebnisse lieferte der Einsatz in einer Endkonzentration von 40 μM.

#### 4.2.2.4 DNA-Einsatz

Da eine positive Korrelation zwischen initial eingesetzter DNA-Menge und falsch positiven PCR-Ergebnissen im Bereich über 3000 Kopien bekannt ist, reduzierten wir den DNA-Einsatz auf das sinnvolle Mindestmaß von 1 μg pro PCR-Ansatz.



### 4.2.3 Primer

In der ursprünglichen „nested“-PCR nach Levi wurden als upper Primer 1s (sense) und als lower Primer 2a (antisense) bzw. 3a verwendet. (siehe 1.4 und 3.4)

Im Rahmen der PCR-Modifikationen setzten wir auch mögliche Primervariationen für den interessierenden DNA-Abschnitt in Kombination mit 1s, 2a und 3a ein und untersuchten, inwieweit sich die Spezifität der PCR steigern ließe.

Die Verwendung einer Kombination aus den Universal-Sequenzierprimern M13 und M13-reverse mit den spezifischen Anteilen von 1s und 3a sollte zeigen, ob auf diese Weise ein direkt sequenzierbares PCR-Produkt zu erhalten wäre. Dazu hätte gewährleistet sein müssen, daß nach der Sequenzierung von der 5'-Seite aus bereits die erste Base hinter dem upper Primer lesbar wäre. Allerdings erzeugten die entsprechend konstruierten Primer zu unspezifische PCR-Produkte, so daß eine weitere Verwendung nicht möglich war.

Die Auswertung der einzelnen Ansätze ergab die besten PCR-Resultate für die Kombination der Primer 1s und 3a. Es zeigte sich, daß diese Primerkombination und 45 PCR-Zyklen nach dem oben aufgeführten Temperaturprofil eine ausreichende Sensitivität bei minimaler Fehlerquote ermöglichen.

Die optimale Primerkonzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  wurde ebenfalls durch Parallelexperimente mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 1 $\mu\text{M}$  ermittelt.

## 4.3 **Endgültige Methode : PCR- Version II**

Die unter 6.2. aufgeführten PCR-Modifikationen erbrachten als endgültige optimierte Version eine PCR mit 45 Zyklen und den Primern 1s und 3a zu den unter 3.4 angegebenen Bedingungen.

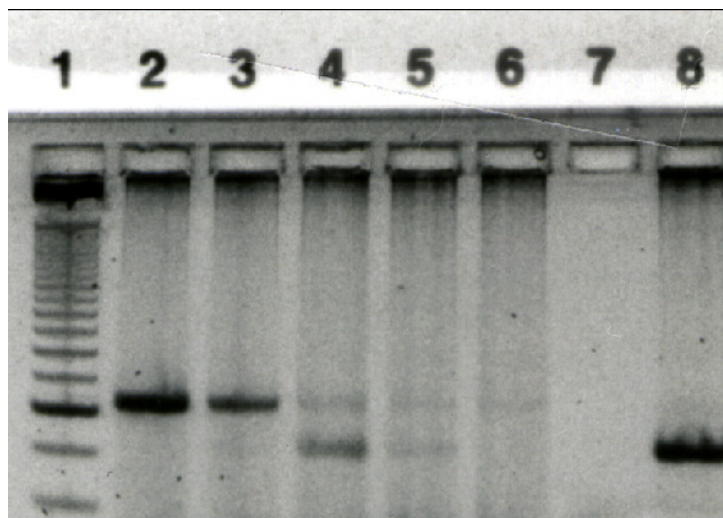
Um die Rate falsch positiver Befunde weiter zu reduzieren, wiederholten wir die Untersuchung bei allen Positivbefunden und werteten nur die in der zweiten PCR reproduzierbaren Ras-Mutationen.

### 4.3.1 PCR-Resultate und Sensitivität

Mit der endgültigen PCR-Version II erreichten wir eine Sensitivität zwischen  $1:10^4$  und  $1:10^5$

bei den Verdünnungsreihen von SW 480-Zellen im Vollblut gesunder Probanden. Auch Verdünnungen von Ras-positiven in Ras-negativen Zelllinien erreichten reproduzierbar diese Sensitivität.

Abbildung 12: Sensitivität mit PCR-Version II



Bahn 1: DNA-Leiter

Bahn 2:  $1:10^2$  ; Bahn 3:  $1:10^3$  ; Bahn 4:  $1:10^4$  ; Bahn 5:  $1:10^5$  ; Bahn 6:  $1:10^6$

Bahn 7:  $H_2O$  ; Bahn 8: Wildtyp

Bei den Blutproben der Patienten mit Pankreaskarzinomen bestätigten sich von 95 Proben 4 (4,2 %) auch in einer Wiederholung der PCR als positiv. Bei einer Blutprobe gelang der Nachweis der entsprechenden Punktmutation des K-Ras-Gens auch im Gewebe des zugehörigen Primärtumors. Bei den übrigen Blutproben stand das Gewebe des entsprechenden Primärtumors leider nicht zur Verfügung.

Allerdings zeigte die Untersuchung von 32 Paraffinschnitten aus Pankreastumoren in 27 Fällen ein zweifach positives Ergebnis, so daß sich die Rate von 84 % „Ras-positiver“ Pankreaskarzinome gut mit den Zahlen aus anderen Studien deckt. (Bos, ras oncogenes in human cancer: a review, cancer research 49, 1989, S. 4682)

Als Negativkontrollen dienten 33 Blutproben gesunder Probanden.

Von den 26 untersuchten Blutproben der Patienten mit Tumoren der Gallenwege / Klatskintumoren zeigten 2 Proben ein schwach positives Ergebnis, ein Mutationsnachweis im Primärtumor konnte bei fehlendem Tumorgewebe nicht erfolgen. Die zur Verfügung stehende Gewebeprobe eines Klatskintumors wies sowohl ein positives PCR-Signal als auch eine Mutation in der Sequenzanalyse auf. Weiterhin wurden 42 Blutproben von Patienten mit kolorektalen Karzinomen untersucht. Während eine Probe nur eine schwache Mutationsbande zeigte, war die andere eindeutig positiv und in diesem Falle ergab auch die PCR des Primärtumors eine Mutation.

Insgesamt ließ sich bei 16 Paraffinschnitten aus kolorektalen Karzinomen mittels PCR in 6 der Fälle eine Mutation des Ras-Gens nachweisen.

#### 4.3.2 Sequenzanalysen

Ergab sich für eine Blut- oder Gewebeprobe eine Ras-Mutation, die sich in der Wiederholung der PCR reproduzieren ließ, erfolgte nach entsprechender Aufarbeitung des PCR-Produktes eine Sequenzanalyse des Ras-Gens.

- Tabelle 2

Patient	Tumor	Blutprobe	Gewebe	1.PCR	2.PCR	Sequenz
B.W.		50		(MUT)	WT	
			P 16	MUT	MUT	CCTGTT
BE.W.		11		WT		
			P 17-A	MUT	MUT	CCTGTT
			P 17-C	MUT	MUT	CCTGTT
B.E.		58		(MUT)	WT	
			P 18/1-A	MUT	MUT	CCTGTT
			P 18/1-X	MUT	MUT	CCTGTT
B.F.		79		WT		
			P 31-A	MUT	MUT	CCTGTT
			P 31-B	MUT	MUT	CCTGTT
B.C.		85		(MUT)	WT	
		105		(MUT)	WT	
		242		WT	WT	
		258		WT		

	281		WT	WT	
		P 32	WT	WT	
B.T.	32		WT		
D.A.	141		WT		
	191		WT	WT	
	231		WT		
D.R.	276		WT		
	280		WT		
D.E.	287				
	288				
	289		WT	WT	
	290				
E.J.	72		WT		
E.X.	42		WT		
E.H.	73		WT		
		P 19	(MUT)	WT	
F.C.	20		WT		
F.F.		P 34-A	MUT	MUT	CCTGTT
		P 34-B	MUT	MUT	CCTGTT
F.J.		P 35	MUT	WT	
F.G.	140		WT		
	304		WT		
FL.J.	63		WT		
F.L.	91		WT		
F.G.	153		WT		
F.E.	77		WT		
	142		WT		
	270		WT		
		P 37/1-A	MUT	MUT	CCTGTT
		P 37/1-B	MUT	MUT	CCTGTT
G.A.	401-A				CCTAGT
	401-B				CCTAGT
	401-D				CCTGAT
		P 38-A			CCTAGT
		P 38-C			CCTAGT
G.M.	74		MUT	WT	
H.R.	144		WT		
	206		WT		
	267		WT		

		P 20-A	MUT	MUT	CCTGTT
		P 20-E	MUT	MUT	CCTGTT
H.H.	315		WT		
	317		WT		
		P 39/2	MUT	MUT	CCTGTT
H.K.	192		WT		
	252		WT		
K.L.	118		WT		
	232		WT		
		P 40-A	?	(MUT)	CCTGAT
		P 40-C	?	(MUT)	CCTGAT
K.M.	402		MUT	MUT	
	352		WT	WT	
		P 42/2-A	MUT	MUT	CCTCGT
		P 42/2-B	MUT	MUT	CCTCGT
		P 42/2-C	MUT	MUT	CCTCGT
K.A.	291		WT		
	292		WT		
	293		WT		
	294		WT		
		P 43-E	MUT		CCTGTT
K.E.	17		WT		
L.A.	382		WT		
L.G.	169		WT		
	193		WT	WT	
	225		WT		
		P 44-B	MUT	MUT	CCTGAT
		P 44-C	MUT	MUT	CCTGAT
L.F.	351-A		MUT	MUT	CCTAGA
	351-B		MUT	MUT	CCTGAT
	351-C		MUT	MUT	CCTGAT
		P 45	WT		
M.M.	403		WT	WT	
		P 21-A	MUT	MUT	CCTGGT
		P 21-C	MUT	MUT	CCTCGT
M.D.	284		WT		
M.G.	59		WT		
	145		WT		
	198		WT		

	271		WT		
M.E.		P 47	WT		
M.G.	368		WT		
		P 48-B	MUT		CCTCGT
		P 48-C	MUT		CCTCGT
		P 48-D	MUT		CCTCGT
N.K.	76		WT		
O.A.	366		WT		
		P 49-B	MUT	MUT	CCTCGT
		P 49-D	MUT	MUT	CCTGAT
O.V.	195		WT		
	244		WT		
	255		WT	WT	
	361		WT	WT	
	366		WT		
	389		WT		
		P 22-A		MUT	CCTGGT
		P 22-B		MUT	CCTAGT
		P 22-D		MUT	CCTAGT
R.X.	207		WT		
S.K.	38		MUT	MUT	
		P 23-A	MUT	(MUT)	CCTGTT
		P 23-B	MUT	(MUT)	CCTGGT
		P 23-C	MUT	(MUT)	CCTGGT
S.M.	127		WT		
	223		WT		
	227		WT		
S.A.	360		WT		
	390		WT		
	397		WT		
	453		WT	WT	
		P 24-A			CCTGTT
		P 24-B			CCTGAT
		P 24-C			CCTGAT
ST.A.	16		WT		
	31		WT		
	106		WT		
	186		WT	WT	
	194		WT	WT	

			P 50-A	MUT	(MUT)	CCTAGT
			P 50-B	MUT	(MUT)	CCTGAT
S.R.		327		WT		
			P 25	MUT	MUT	CCTAGT
S.K.		124		WT	WT	
		197		WT		
		228		WT	WT	
		275		WT	WT	
			P 26-A	MUT	MUT	CCTAGT
			P 26-C	MUT	MUT	CCTAGT
			P 26-D	MUT	MUT	CCTTGG
S.J.		461-A		WT	(MUT)	CCTGAT
		461-B		WT	(MUT)	CCTGTT
		461-D		WT	(MUT)	CCTGTT
			P 27	WT	WT	
U.A.	Pankreas	25-A		MUT	(MUT)	CCTAGT
		25-B		MUT	(MUT)	CCTAGT
		25-D		MUT	(MUT)	CCTAGT
			P 28-A	MUT	MUT	CCTGAT
			P 28-B	MUT	MUT	CCTGAT
W.E.	Pankreas	14-A		(MUT)	(MUT)	CCTGAT
		14-B		(MUT)	(MUT)	CCTGAT
			P 29-A	MUT	MUT	CCTGGT
			P 29-D	MUT	MUT	CCTTGT
			P 29-E	MUT	MUT	CCTTGT
W.N.		51		WT	WT	
			P 30	WT	WT	
W.H.		380		(MUT)	WT	

## 5 Diskussion

Die Etablierung der Polymerase Chain Reaction als molekularbiologische Methode zur gezielten Amplifizierung von DNA-Abschnitten hat es u.a. ermöglicht, einzelne Gene und ihre Mutationen aufzudecken und zu charakterisieren. Insbesondere im Bereich der Erforschung der Wachstumsregulation von Zellen und speziell der Karzinogenese hat die PCR dadurch vielfältige Möglichkeiten eröffnet.

Seit langem ist die große Bedeutung von Ras-Mutationen für die Tumorentstehung auch beim Menschen bekannt, die hohe Mutationshäufigkeit bei Karzinomen des Gastrointestinaltraktes hat zu Studien über die Chancen des klinischen Einsatzes der molekularbiologischen Methoden ermutigt.

Nach Etablierung der in der Literatur beschriebenen Mismatch-PCR zur Detektion von Mutationen des K-Ras-Gens, sollten unsere Untersuchungen die Spezifität und Sensitivität des Mutations-Nachweises in Blut-, Gewebe- und Sekretproben überprüfen. Es galt zu klären, ob eine Korrelation zwischen Tumorstadium und Nachweis von mutiertem Ras-Gen im peripheren Vollblut besteht und somit ein „genetisches Monitoring“ möglich bzw. ein hilfreiches diagnostisches Instrument gefunden wäre. In der weiteren Entwicklung hätte so evtl. ein Parameter zur Beurteilung des Ansprechens von Tumorerkrankungen auf Chemotherapien zur Verfügung gestanden. In erster Linie untersuchten wir diese Fragestellung bei Pankreaskarzinomen, da dieser Tumor für die frühzeitige Absiedelung von Tochterzellen und sein schlechtes Ansprechen auf Therapien bekannt ist.

Die Etablierung der u.a. von Levi beschriebenen Methode einer Mismatch-PCR mit RLFP gelang nicht, wie die unter 4.1 aufgeführten Ergebnisse verdeutlichen. Bereits die Untersuchungen von Verdünnungsreihen zur Ermittlung der Sensitivität des Verfahrens lieferten differente Ergebnisse bei zudem schlechter Reproduzierbarkeit. Erste Untersuchungsreihen an Blutproben von Patienten mit Pankreaskarzinomen erbrachten eine Nachweisrate für K-Ras-Mutationen von 81% (30 von 37 Proben Ras-positiv). Angesichts der Tatsache, daß sich mutiertes Ras direkt im Gewebe von Pankreaskarzinomen in 80 – 90% der Fälle findet, handelte es sich hierbei um eine extrem hohe Nachweisrate – auch wenn sich die Werte mit den Studienergebnissen von Mulcahy et al. aus dem Jahre 1998 decken. Die Wasserproben sowie mituntersuchte DNA von 6 gesunden Probanden zeigten keine Mutationen. Daher



schien eine Kontamination weitgehend ausgeschlossen. Doch abgesehen von den hohen Nachweisraten ließen variierende Resultate bei Wiederholung der PCR an neuen Blutproben von bereits analysierten Patienten Zweifel an der Zuverlässigkeit der Methode aufkommen. Ob sich das Neuauftreten der Mutation im Blut bei 2 von 7 anfangs Ras-negativen Patienten mit dem Fortschreiten der Erkrankung erklärt, bleibt fraglich. Bei 4 der anfangs Ras-positiven Patienten ließ sich die Mutation in der Wiederholungs-PCR nicht nachweisen. Dies kann jedoch nicht als Effekt einer Chemotherapie gewertet werden, da sich nur 2 der 4 Patienten zur Zeit der Blutabnahmen in entsprechender Behandlung befanden.

Zur weiteren Abklärung dieser fraglichen Befunde führten wir die Versuche im Blut zahlreicher gesunder Probanden durch. Dabei zeigten sich bei 12 von 16 Proben Mutationsbanden in unterschiedlicher Stärke. Um Reste von nicht verdautem Ras-Wildtyp, der sich bei einer verbliebenen Fragmentlänge von 157 bp mit in der Mutationsbande des Gels darstellt, zu verhindern, unterzogen wir die Proben einem Nachverdau mit BstN I. Danach zeigten sich zwar nur noch bei 5 Proben Mutationsbanden, aber diese stellten dennoch falsch-positive Ergebnisse dar.

Da das Kontaminationsrisiko bei einer „nested“-PCR durch die außerordentliche Empfindlichkeit der Methode bekanntermaßen besonders hoch ist, hielten wir uns nicht nur an die üblichen Vorsichtsmaßnahmen, sondern trennten zusätzlich die Pipettierschritte für erste und zweite PCR räumlich, um die Möglichkeit von Kontaminationen, insbesondere der Proben untereinander, auf ein Minimum zu reduzieren.

Der Nachverdau bei Ras-positiven Proben wurde grundsätzlich durchgeführt, dennoch erhielten wir wiederholt falsch-positive Resultate. Das heißt ein möglicher Anteil an unverdautem Wildtyp war weitgehend ausgeschlossen und es war von „tatsächlichen“ Ras-Mutationen auszugehen. Besonders auffallend waren diese Ergebnisse bei Untersuchungen an Ras-negativen Kontrollzelllinien. Mögliche Spontanmutationen bei den immortalisierten Zelllinien im Verlauf der Kultivierung waren insofern als Erklärung unwahrscheinlich, als die Mutationen unabhängig von der Anzahl der Passagen, der jeweiligen Kultivierungsdauer und Art der Kontrollzelllinie auftraten. Die Zelllinien zur Positivkontrolle zeigten sich allerdings stets erwartungsgemäß Ras-positiv.

Das PCR-Produkt einiger bis dahin analysierter Blut- und (soweit vorliegend) Gewebeproben wurde sequenziert, um die „falschen“ Mutationen näher zu

charakterisieren. Die Mutationen zeigten sich an erwarteter Stelle, doch nur in einem Fall stimmte der Basenaustausch in der DNA der Blutprobe mit dem im Tumorgewebe überein. In den übrigen Fällen zeigten sich in den Blutproben andere Punktmutationen als im Gewebe. Der Austausch gegen unterschiedliche Basen und an verschiedener Position sprach zumindest gegen eine generalisierte Verunreinigung des Ansatzes. Bei einigen Gewebeproben konnten wir sogar Sequenz-Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen feststellen; das heißt, daß sich in der Mutationsbande eines PCR-Produktes DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Ras-Mutationen befunden haben. Für das Auftreten derartiger Veränderungen im Verlauf der Klonierung gibt es keinerlei Anhaltspunkte, womit das Vorliegen zweier unterschiedlicher Mutationen im Ausgangsmaterial oder Veränderungen im Laufe der PCR-Amplifizierung vermutet werden müssen. Verschiedene Mutationen bei einem Primärtumor sind vorbeschrieben und werden insbesondere mit multizentrischen Pankreaskarzinomen in Verbindung gebracht (Motojima et al., 1993). Es handelte sich in dieser Sequenzierung jedoch ausschließlich um Proben von Patienten mit Colonkarzinomen, und v.a. angesichts der geringen Anzahl der sequenzierten Proben kann dies nicht als einzige Erklärung der unerwarteten Resultate dienen.

Somit erhärteten die Ergebnisse der Sequenzanalyse der „falsch-positiven“ Kontrollzelllinien den Verdacht auf eine hohe Fehleranfälligkeit der verwendeten PCR-Methodik. Es fand sich sowohl eine Ras-Mutation am „hot spot“, dem zweiten G im ersten Exon von Codon 12, als auch eine Deletion in den DNA-Sequenzen der beiden Proben von HT 29 und Hep G2.

Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten wie bereits erwähnt unverdauten Wildtyp in den Mutationsbanden. So erschien 1998 eine Arbeit von Huber et al., die den Einsatz des hitzestabilen Restriktionsenzym BstN I direkt im PCR-Ansatz etablierte. Sie zeigten durch Einzelversuche, daß die Enzymaktivität trotz der Temperaturwechsel während der PCR zu ca. 50% erhalten bleibt und keine Inhibition der Polymerase durch das Restriktionsenzym zu befürchten ist. Auf diese Weise werden nicht mutierte PCR-Produkte bereits bei ihrer Entstehung gespalten und stehen anschließend nicht mehr als Matrizen zur Verfügung. Wir versuchten zusätzlich durch die Kombination verschiedener Restriktionsenzyme und weiterer Verdauschritte, die Rate an amplifiziertem Wildtyp zu senken, erzielten jedoch im

Vergleich zu den Ergebnissen mit dem Einsatz von BstN I in der PCR nach Huber und anschließendem Nachverdau keine Verbesserungen.

Insgesamt machten diese Beobachtungen deutlich, daß die in mehreren veröffentlichten Arbeiten angewandte Methodik keine ausreichende Zuverlässigkeit gewährleistet. Die bisherigen Resultate hatten gezeigt, daß die Taq-Polymerase unter den angegebenen Bedingungen mit nur unzureichender Genauigkeit arbeitet. So fanden sich die Lese- bzw. Synthesefehler der Taq-Polymerase hauptsächlich in dem für Mutationen in vivo speziell anfälligen Bereich in Codon 12 des Ras-Gens. Es ist fraglich, inwiefern derartige „hot spots“ auch in vitro für Mutationen bzw. Methodenfehler prädestiniert sind.

Jacobs et al. erhielten in ihrer Arbeit 1999 über den Nachweis von K-Ras-Mutationen in peripherem Vollblut, in der Leukozytenfraktion sowie im Blutplasma von Tumorpatienten und gesunden Probanden ähnliche Ergebnisse. Wiederholt fanden sich unter den Negativkontrollen falsch positive PCR-Banden, so daß diese Arbeitsgruppe systematisch und mit Hilfe statistischer Simulation alle Faktoren untersuchte, die Einfluß auf die Fehlerrate der Taq-Polymerase nehmen.

Dementsprechend war nur durch eine Überprüfung der kritischen Parameter zur Optimierung der PCR und durch experimentelle Ermittlung der besten PCR-Bedingungen die Erhöhung von Effektivität und Spezifität der Reaktion, und damit eine Reduktion der Fehlerraten zu erreichen.

Die bedeutsamen Faktoren hierfür sind in erster Linie die Qualität und Konzentration der Matrize, der spezifische Aufbau der Primer und die Wahl der geeigneten Polymerase. Um eine möglichst hohe Synthesegenauigkeit des Enzyms zu erreichen, müssen wiederum optimale Bedingungen für die Polymerase geschaffen werden.

Theoretisch läßt sich mit der PCR ein einziges Molekül aus der Matrize vervielfältigen, Standard ist jedoch der Einsatz von ca. 1 µg genomischer DNA. Die Bedeutung für die Spezifität der Reaktion betonten auch Jacobs et al. in ihrer bereits erwähnten Arbeit. Sie stellten bis zu einer Anzahl von 3000 Kopien eine lineare Korrelation zwischen dem Anteil falsch positiver Befunde und der initialen DNA-Menge fest, wobei die Kurve im Bereich ab 10 000 Kopien eine Sättigung erreicht (Jacobs et al., 1999, S.397-398). Wir bestimmten die Konzentration der präparierten

DNA wie vorbeschrieben im Photometer und setzten durchschnittlich knapp 1 µg in die PCR ein. Die Photometermessung erlaubte mit Einschränkungen auch eine Abschätzung der Reinheit der DNA. Um eine hohe Qualität der Matrize zu erhalten, ist es wichtig, bereits während der DNA-Präparation sorgfältig Reste von Reagenzien zu entfernen, die die Reaktion möglicherweise behindern könnten. Da Heparin ein starker Inhibitor der PCR ist, wurde daher bereits die Blutabnahme in Röhrchen mit EDTA- statt mit Heparinzusatz durchgeführt. Auch Porphyrinverbindungen aus den Erythrozyten können inhibitorisch wirken, weswegen eine Lyse mit entsprechendem Puffer erfolgte und die Leukozyten, wie unter 3.3.1 erläutert, abzentrifugiert wurden. Weitere zur DNA-Extraktion verwendete Substanzen wie Proteinase K oder SDS entfernten wir durch Denaturierung bei 95 °C oder Phenolextraktion. Ebenfalls PCR-inhibitorische Phenolreste wurden anschließend mit Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert.

Diese Maßnahmen zur Qualitätssicherung der DNA-Matrize wurden zwar von Anfang an berücksichtigt, erlangten jedoch nach Bekanntwerden der Probleme mit der ursprünglichen PCR-Methodik verstärkt Bedeutung.

Die **Primer** für die ursprüngliche Mismatch-PCR wählten wir entsprechend derer aus den Arbeiten von Levi und Kahn. Der „upper“-Primer 1s ist 30 Nucleotide lang ( $T_m = 52,1\text{ °C}$ ), die „lower“-Primer bestehen aus 20 (Primer 2a;  $T_m = 40,9\text{ °C}$ ) bzw. 30 Nucleotiden (Primer 3a;  $T_m = 51,3\text{ °C}$ ), damit liegen sie im Bereich der gängigen Nucleotidanzahl und in einem Bereich mit Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) bis 60 °C und mit relativ großer Primerstabilität im Verlauf der Reaktion. Auch bezüglich des Basengleichgewichtes und komplementärer Strukturen der Primer untereinander berücksichtigten wir die entsprechenden Auswahlkriterien, um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen. Durch Veränderungen der Nucleotidanzahl konnten wir weder Effektivität noch Spezifität der PCR erhöhen (siehe auch 4.2.3).

Den größten Einfluß auf die Spezifität und das Entstehen falsch positiver Befunde hat jedoch die Kopiergenauigkeit der DNA-Polymerase, die wiederum von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Dazu zählen die Konzentration an dNTPs und an Magnesiumionen, der pH-Wert der Reaktion und das Temperaturprofil der PCR. Entsprechende Auswirkungen hat auch die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen.

Die Wahl der **Polymerase** fiel bei unserer Arbeit aufgrund des Einsatzes von Mismatch-Primern und der Position der Schnittstelle für das Restriktionsenzym am

3'- Ende des DNA-Fragments auf eine Taq-Polymerase. Die höhere Kopiergenauigkeit einer Proofreading-Polymerase wäre zwar für unsere Untersuchungen vorteilhaft gewesen, aber ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität hätte den Einbau der Schnittstelle und damit die Analyse mittels RLFP verhindert, wie unter 4.2.2.2 aufgeführt. Daher war es wichtig bei der höheren Fehlerrate der Taq-Polymerase die übrigen Reaktionsbedingungen zu optimieren, um eine hohe Genauigkeit bei höchstmöglicher PCR-Ausbeute zu erhalten.

Bei der Veränderung der PCR-Bedingungen hatte in unseren Untersuchungen die Variation der **dNTP-Konzentration** mit die größten Effekte. In der ursprünglichen Mismatch-PCR hatten wir dNTPs in einer Konzentration von 100µM eingesetzt, mehrfache Ansätze zeigten jedoch, daß eine Reduktion bis auf 40 µM bei gleichbleibender PCR-Ausbeute möglich ist. In der PCR-Version II setzten wir so die dNTPs nur noch in dieser minimalen Konzentration ein, da die Taq-Polymerase bei niedrigeren dNTP-Konzentrationen präziser kopiert. Eine hohe Dichte an dNTPs erhöht die Produktion unkomplementärer Basenpaare, sog. „Mispairs“, indem sie die Reaktion zugunsten der Polymerisation beschleunigt. Bei fehlender Exonukleaseaktivität führt eine minimale dNTP-Konzentration zu einem Abbruch der Verlängerung, wenn terminale Mispairs entstanden sind, so daß die fehlerhaften Basenfolgen in den weiteren Amplifikationsrunden nicht mehr als Matrize zur Verfügung stehen. Auf diese Weise kann eine niedrige dNTP-Konzentration zusätzlich die Spezifität der PCR-Reaktion erhöhen (Eckert et Kunkel, 1991, S.225-232).

Die dNTPs bilden mit **Magnesiumionen** zusammen einen löslichen Komplex, der für den dNTP-Einbau ausschlaggebend ist. Daher ermittelten wir in kombinierten Versuchen neben der besten dNTP-Konzentration auch die für unsere Bedingungen optimale Menge an Magnesiumionen. Zu geringer Einsatz reduziert die PCR-Ausbeute, während bei hohen Konzentrationen vermehrt unspezifische Produkte entstehen. Darüberhinaus stimulieren Magnesiumionen die Polymeraseaktivität und erhöhen die  $T_m$  des DNA-Doppelstrangs sowie der Bindung Primer-Matrize. Da im PCR-Ansatz neben der DNA auch dNTPs und Proteine Magnesiumionen binden und die genaue Konzentration an ungebundenen Ionen meist unbekannt ist, läßt sich die optimale Magnesiummenge nur durch Experimente speziell für die einzelne Reaktion ermitteln. In unserer Studie erbrachte bei einer optimalen dNTP-Konzentration von

40µM eine Magnesiumkonzentration von 11mM die besten Ergebnisse, was der vom PCR-Puffer gelieferten Menge entsprach.

Auch der **pH-Wert** hat erheblichen Einfluß auf die Kopiergenauigkeit der Polymerase; optimal ist ein pH zwischen 5 und 6; ab einem pH von 8,2 dagegen läßt sich eine signifikante Steigerung der Fehlerraten beobachten. Es ist jedoch fraglich, inwieweit eine Veränderung des pH-Wertes des Reaktionsansatzes möglich ist, ohne die restlichen Parameter empfindlich zu stören. Wir verzichteten daher bei der Modifikation unserer Methode auf Experimente in diesem Bereich.

Allerdings spielt der pH-Wert im Zusammenhang mit dem Einfluß des Temperaturprofils eine nicht zu unterschätzende Rolle, da bei Temperaturen über 50°C der pH-Wert des verwendeten Tris-Puffers um ca. 2 Einheiten sinkt und so die Kopiergenauigkeit positiv beeinflusst wird. Im übrigen erhöht sich nämlich im Bereich über 50°C die Fehlerrate der Polymerase um ein Vielfaches, aber auch die Syntheserate steigt bei zunehmender Temperatur enorm an.

Temperatur und pH-Wert beeinflussen darüberhinaus Mutationen bzw. Schädigungen der nativen DNA. Deswegen sollten in letzter Konsequenz die PCR-Zeiten mit hohen Temperaturen auch im Hinblick auf pH-Wert-Änderungen möglichst kurz gehalten werden.(Eckert et Kunkel, 1991, S.233-237)

Die **Anzahl der Reaktionszyklen** der PCR gehört auch zu den Faktoren, die für die Fehlerraten ausschlaggebend sind. Jacobs et al. konnten zeigen, daß zwischen der Anzahl an PCR-Zyklen und der Rate an falsch-positiven Resultaten eine lineare Korrelation besteht. Insbesondere beim ursprünglichen Verfahren der „nested“-PCR hatte eine hohe Zyklenzahl in der ersten PCR bei entsprechender Fehlerquote verheerende Auswirkungen durch erneute Vervielfältigung in der zweiten PCR. In der PCR-Version I dieser Studie durchlief die erste PCR 25 Zyklen, die zweite 30 Zyklen. Im Rahmen der Veränderung der ursprünglichen Methode reduzierten wir anfangs auf bis zu 12 Zyklen in der ersten PCR, die zweite PCR amplifizierte dann über 28 Zyklen, um noch eine ausreichende Vervielfältigung der Mutationen zu erreichen. Im Laufe der weiteren Entwicklung konnten wir auf die nested-PCR verzichten und arbeiteten mit nur noch einer PCR mit 45 Zyklen. Entsprechende Versuche bestätigten, daß unter den neuen Bedingungen bei hoher Sensitivität keine außerordentliche Fehlerrate auffiel.

Zusammen mit den Variationen der Zyklenzahl suchten wir auch nach einer Optimierung des **Temperaturprofils** der PCR. Auf den Einfluß der Temperatur und

mit ihr des pH-Wertes auf die Genauigkeit der Reaktion wurde bereits ausführlich eingegangen. Die optimale Temperatur für die Taq-Polymerase liegt bei 70-80° C, in diesem Bereich hat sie mit 35 bis 100 Nucleotiden pro Sekunde die größte Syntheseleistung. Die Schmelztemperaturen der in der PCR-Version II verwendeten Primer liegen bei 52,1° C (Primer 1s) und 51,3° C (Primer 3a), die geeigneten Bindungstemperaturen liegen 3 - 12° C oberhalb dieser Schmelztemperaturen. Zu Beginn der PCR ist eine Erhitzung auf 95-100°C nötig, um die genomische DNA vollständig zu denaturieren; ab dem zweiten Zyklus sind aber meist geringere Denaturierungstemperaturen ausreichend. Zur Vermeidung von Hitzeschäden der Matrize reduzierten wir in der PCR-Version II die Denaturierungstemperatur auf 91° C, auch im Zyklusablauf hielten wir mit 15 sec die Denaturierungszeiten so kurz als möglich. Die optimale Annealingtemperatur wurde durch Gradienten-PCRs im möglichen Bereich von 54 bis 64°C ermittelt, die besten Resultate erhielten wir bei einer Bindungstemperatur von 55°C. Ebenfalls experimentell ermittelt wurde die Extensions-Temperatur. Die Verlängerung sollte bei möglichst niedriger Temperatur und trotzdem zufriedenstellender Prozessivität des Enzyms erfolgen; wir konnten von den meist gebräuchlichen 72°C bis auf 64°C reduzieren.

Durch vielfache Ansätze auf der Grundlage der bekannten Parameter zur Optimierung von PCR-Reaktionen gelang die Entwicklung einer PCR-Version (II), die bei einer erstaunlich hohen Sensitivität von 1:10<sup>4</sup> bis 1:10<sup>5</sup> eine minimierte Fehlerrate aufweist. Um die Rate an falsch-positiven PCR-Resultaten weiter zu reduzieren, legten wir fest, daß nur diejenigen Befunde als Positivbefunde zu werten waren, die in einer Wiederholung der PCR aus der Ausgangs-DNA ebenfalls die Mutationsbande aufwiesen.

Die Untersuchung der großen vorliegenden Probenzahl unserer Arbeit nach dieser Methode zeigt, daß die Nachweisrate für mutiertes Ras in der Leukozytenfraktion des Blutes außerordentlich gering ist (siehe Tabelle 2 ). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der PCR-Version I mit Ras-Mutationen der Blutproben in 81 % (siehe 4.3.1) fand sich nur im Blut von 4 der 95 Patienten (4%) mit Pankreaskarzinomen die Mutation. Bei einem der 4 Ras-positiven Patienten stand auch Tumorgewebe zur Verfügung. Auch hier zeigte die PCR eine Ras-Mutation, die Sequenzanalyse

erbrachte jedoch unterschiedliche Basenfolgen: im Blut cct AGg, im Tumorgewebe cct GAg.

Die Nachweisrate bei den Gewebeproben war mit 84% hoch, womit sich unsere Ergebnisse mit den Daten aus der Literatur deckten. Allerdings zeigten sich vergleichbar zur ersten Sequenzierung von PCR-Produkten aus PCR-Version I (siehe Tabelle1) mehrfach Unterschiede zwischen den Mutationen der einzelnen Klone.

Es bleibt fraglich, ob es sich bei den 4 nachgewiesenen Mutationen im Blut um „echte“ Mutationen des Ki-Ras-Gens handelt oder sie Repräsentanten der verbliebenden Fehlerquote der PCR sind. Da mit der neuen Methodik fast nie mehr falsch-positive Negativkontrollen aufgetreten waren, könnte bei diesen Proben tatsächlich ein glaubwürdiger Ras-Nachweis gelungen sein. In dieser Hinsicht sind auch die PCR-Befunde der Gewebeproben glaubwürdig.

Doch lassen sich die Ergebnisse der Sequenzanalysen nicht eindeutig zuordnen. Einerseits sind methodische Fehler auch mit der neuen PCR-Version nicht ausgeschlossen, andererseits wurden in der Zeit seit Abschluß der Untersuchungen mehrere Arbeiten veröffentlicht, die mögliche Erklärungen für unsere Beobachtungen liefern. So wurden bei Tumorerkrankungen häufiger verschiedene Mutationen gefunden und auch von Veränderungen von Mutationen im Verlauf von Erkrankungen wurde berichtet.

Eine **Korrelation zum Stadium der Tumorerkrankung** ist bei derart niedrigen Nachweisraten kaum möglich, zumal sich nicht einmal in verschiedenen Blutproben eines Patienten eine Konstanz aufzeigen ließ. Dazu waren an mehreren, kurz aufeinanderfolgenden Tagen immer wieder den gleichen Patienten Blutproben abgenommen worden - es zeigte sich keine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Bereits 1994 hatte Caldas mutiertes **Ras auch in muzinösen Zellhyperplasien** beschrieben - zwischenzeitlich gibt es Arbeiten über den Nachweis von Mutationen im Blut gesunder Probanden, wobei noch nicht klar ist, wie diese Befunde zu werten sind.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, welche Aussagekraft der Nachweis von mutiertem Ras im Blut überhaupt hat, selbst wenn man von allen methodenimmanenten Fehlerraten absieht.

Zweifelsohne ist jedoch angesichts des aktuellen Forschungsstandes an eine Anwendung der Ras-PCR im peripheren Blut zur Unterstützung von Tumordiagnostik



oder Therapiemonitoring nicht zu denken. Konsequenterweise müssen diese Vorbehalte auch dem Ras-Nachweis in Sekretproben entgegengebracht werden.

## 6 Zusammenfassung

Die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden wie der PCR und detaillierte Erkenntnisse über das Vorkommen und die Bedeutung der Ras-Gene für Tumorentwicklung und –wachstum weckten die Hoffnung auf eine Verbesserung der Diagnose- und Therapiemöglichkeiten maligner Erkrankungen.

Insbesondere für das Pankreaskarzinom mit seiner fatalen Prognose (5-Jahres-Überlebensrate unter 5%, medianes Überleben von 4-6 Monaten) bei äußerst geringen Therapieoptionen wurde und wird eine Umsetzung der neuen Erkenntnisse im klinischen Bereich dringend angestrebt. In hohen Prozentzahlen (bis zu 90%) fanden sich Ras-Mutationen im Gewebe duktaler Adenokarzinome des Pankreas, aber auch in Sekreten (Pankreassaft) und Feinnadelbiopsien der Primärtumore ließen sich genetische Veränderungen im K-Ras-Gen aufzeigen. Im Tumorprogressionsmodell für das duktale Pankreaskarzinom, das in den letzten Jahren entwickelt wurde, zählen Punktmutationen des Ras-Protoonkogens zu den frühesten Ereignissen in der Entwicklung eines invasiven Karzinoms aus Hyperplasien mit steigendem Dysplasiegrad. Unsere Arbeit sollte die Möglichkeit eines sensitiven und spezifischen Nachweises der Ras-Mutationen im peripheren Vollblut untersuchen und somit eine mögliche Anwendung der molekularbiologischen Methodik zur Verbesserung der Diagnostik und ferner zur Kontrolle des Therapieeffekts testen.

Zu Beginn unserer Untersuchungen stand die Etablierung der in der Literatur mehrfach beschriebenen Methode der „nested“-PCR mit mismatch-Primern (Levi et al., 1991, S.3497-3502) und anschließender Gelanalyse (RLFP) zur Detektion von Mutationen des K-Ras-Gens an Codon 12. Bereits Ansätze zur Ermittlung der Sensitivität ergaben keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Analyse der Blutproben von gesunden Probanden sowie die Analyse der Kontrollzelllinien erbrachten gehäuft falsch-positive Befunde, so daß eine Veränderung der Methodik erforderlich war. Entsprechend war der „Ras-Nachweis“ bei den untersuchten Blutproben der Tumorpatienten der II.Medizinischen Klinik (des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München) unglaublich häufig.

Eine Modifikation des Enzym-Verdau durch Erhöhung der BstN1-Menge und Verlängerung der Verdauzeit, sowie Optimierung der Reaktionsbedingungen für das Enzym sollten zur Reduktion von vermutlich ungeschnittenem Wildtyp führen. Da die

PCR-Resultate weiterhin schlecht reproduzierbar blieben und sich immer noch falsch-positive Banden ergaben, erhofften wir genauere Erkenntnisse über die „Schwachstellen“ der Methode durch eine Sequenzanalyse der fragwürdigen Proben. Um die Sequenzierung zu ermöglichen, vervielfältigten wir das PCR-Produkt durch Klonierung und Transformation.

Unter 8 verschiedenen Patienten stellten wir daraufhin nur in einem Fall eine exakte Übereinstimmung zwischen Basenabfolge in Blutprobe und Tumorgewebe fest, ansonsten tauchten sogar Differenzen zwischen den Mutationen der einzelnen Bakterienklone aus einem PCR-Endprodukt auf. Damit ergab sich eine unakzeptabel hohe Fehlerrate der eingesetzten PCR-Version.

In mehreren Schritten folgte eine Weiterentwicklung der ursprünglichen PCR-Methode mit Restriktionsenzymverdau: Das Auftreten von ungeschnittenem Wildtyp konnte durch Einsatz des Enzyms bereits während der PCR fast vollständig verhindert werden, dagegen verbesserte der Einsatz von anderen Restriktionsenzymen oder von Enzymkombinationen die Resultate kaum.

Anschließend wurden schrittweise alle auf die Fehlerrate der PCR einflußnehmenden Faktoren modifiziert, um die optimalen Bedingungen zu ermitteln. Es erfolgte eine Änderung des Temperaturprofils, der Primerkombination, der dNTP- und der Magnesiumionenkonzentration, sowie die Reduktion der eingesetzten DNA-Menge aufs nötige Mindestmaß.

So konnte die dann endgültige PCR-Version definiert werden, die bei guter Sensitivität zwischen  $1:10^4$  bis  $1:10^5$  eine minimierte Fehlerrate aufwies. Darüberhinaus werteten wir zur weiteren Erhöhung der Spezifität nur diejenigen Befunde als Positivbefunde, die sich in einer zweiten PCR als solche bestätigten.

Damit fanden sich bei den Blutproben der Patienten mit Pankreaskarzinom in 4 von 95 Fällen K-Ras-Mutationen (= 4,2%); die 32 untersuchten Paraffinschnitte waren in 84% „ras-positiv“, was den in anderen Studien vorbeschriebenen Resultaten entspricht. Den Zahlen nach glaubten wir die Methode als valide; aufgrund der geringen Nachweisraten im Blut und dem hohen methodischen Aufwand ist sie allerdings für den klinischen Einsatz kaum geeignet.

Zusätzlich enttäuschten die Ergebnisse der Sequenzanalysen der PCR-Endprodukte, es fanden sich wiederum Differenzen zwischen dem Basenaustausch der Punktmutationen der einzelnen Bakterienklone eines PCR-Produktes. Auch im parallel zur Blutprobe analysierten Primärtumor stimmte jeweils der Basenaustausch

nicht überein. Inwieweit diese Ergebnisse Repräsentanten der verbliebenen Fehlerquote der neuen PCR-Methode sind, oder „echte“ Mutationen darstellen, bleibt fraglich. Denn auch wenn es Erkenntnisse über verschiedene Punktmutationen in einem Tumor gibt, ist eine genaue Zuordnung letztendlich doch unmöglich.

Aufgrund dieser Beobachtungen scheint ein sinnvoller klinischer Einsatz der PCR zur Detektion von Ras-Mutationen insbesondere im Blut unmöglich, auch die veröffentlichten Ergebnisse der Untersuchungen an Pankreassekreten mittels der ursprünglich verwendeten Methode sollten äußerst kritisch beurteilt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aaronson, S.A.; Growth factors and cancer. *Science*, Vol. 254 (1991) 1146-1153
- Ajiki, T., Onoyama, H., Yamamoto, M., Fujimori, T., Maeda, S., Saitoh, Y.; Detection of point mutations in K-ras gene at codon 12 in bile from percutaneous transhepatic choledochal drainage tubes for diagnosis of biliary strictures. *International Journal of Pancreatology*, Vol. 18, No. 3 (1995) 215-220
- Alexander, F., Rossi, R.L., O`Bryan, M., Khettry, U., Braasch, J.W., Watkins, E.; Biliary carcinoma. *The American Journal of Surgery*, Vol. 147 (1984) 503-509
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K.; Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain c-k-ras genes. *Cell* 53 (1988) 549-554
- Barbacid, M.; Ras genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56 (1987) 779-827
- Berndt, C., Haubold, K., Wenger, F., Brux, B., Muller, J., Bendzko, P., Hillebrand, T., Kottgen, E., Zanow, J.; K-ras mutations in stools and tissue samples from patients with malignant and nonmalignant pancreatic diseases. *Clin. Chem.* (1998) 2103-2107
- Berthélemy, P., Bouisson, M., Escourrou, J., Vaysse, N., Rumeau, J.L., Pradayrol, L.; Identification of K-ras mutations in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann. Intern. Med.* 123 (1995) 188-191
- Bertram, S., Gassen, H.G.; „Gentechnische Methoden“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991
- Bos, J.L.; The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation Research* 195 (1988) 255-271
- Bos, J.L.; Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research* (1989) 4682-4689
- Bos, J.L., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J.H., van der Eb, A.J., Vogelstein, B.; Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancer. *Nature*, Vol. 327 (1987) 293-297
- Caldas, C., Hahn, S.A., Hruban, R.H., Redston, M.S., Yeo, C.J., Kern, S.E.; Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Research* 54 (1994) 3568-3573
- Caldas, C., Kern, S.E.; K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *International Journal of Pancreatology*. Vol.18, No.1 (1995) 1-6

- Cameron, J.L., Christ, D.W., Sitzmann, J.V., Hruban, R.H., Boitnott, J.K., Seidler, A.J., Coleman, J.; Factors influencing survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. *The American Journal of Surgery*, Vol. 161 (1991) 120-125
- Cameron, J.L., Pitt, H.A., Yeo, C.J., Lillemoe, K.D., Kaufman, H.S., Coleman, J.; One hundred and forty-five consecutive pancreaticoduodenectomies without mortality. *Annals of Surgery*, Vol. 217, No. 5 (1993) 430-438
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, Brian, Graziani, A., Kapeller, R., Soltoff, S.; Oncogenes and signal transduction. *Cell* (1991) 281-302
- Castells, A., Puig, P., Mora, J., Boadas, J., Boix, L., Urgell, E., Sole, M., Capella, G., Lluís, F., Fernandez-Cruz, L., Navarro, S., Farre, A.; K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J.Clin. Oncol.*, Vol. 17, No. 2 (1999) 578-584
- Cowgill, S.M., Muscarella, P.; The genetics of pancreatic cancer. *The American Journal of Surgery* 186 (2003) 279-286
- Daus, H., Trümper, L., Bürger, B., Jacobs, G., Kriener, S., v. Blohn, G., Zeitz, M., Pfreundschuh, M.; Ki-ras-mutation als molekularer Tumormarker für Pankreaskarzinome. *Dtsch. Med. Wschr.* 120 (1995) 821-825
- Diamantis, I., Karamitopoulou, E., Perentes, E., Zimmermann, A.; P53 protein immunoreactivity in extrahepatic bile duct and gallbladder cancer: correlation with tumor grade and survival. *Hepatology* (1995) 774-778
- Ebert, M., Schandl, L., Schmid, R.M.; Differentiation of chronic pancreatitis from pancreatic cancer: recent advances in molecular diagnosis. *Dig. Dis.* 19 (2001) 32-36
- Eckert, K.A., Kunkel, T.A.; The fidelity of DNA polymerases used in the polymerase chain reactions; in „PCR – A practical approach“ , Mc Pherson, M.J., Quirke, P., Taylor, G.R.; Oxford University Press, Oxford, 3.Auflage, 1993, 225-255
- Eskelinen, M.J., Haglund, U.H.; Prognosis of human pancreatic adenocarcinoma: review of clinical and histopathological variables and possible uses of new molecular methods. *Eur. J. Surg.* (1999) 292-306
- Field J.K., Spandidos D.A.; The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review). *Anticancer research*, Vol. 10 (1990) 1-22

- Gibby, D.G., Hanks, J.B., Wanebo, H.J., Kaiser, D.L., Tegtmeyer, C.J., Chandler, J.G., Jones, R.S.; Bile duct carcinoma. *Annals of Surgery*, Vol. 202, No. 2 (1985) 139-144
- Halaschek-Wiener, J., Wachek, V., Schlagbauer-Wadl, H., Wolff, K., Jansen, B.; A novel Ras antagonist regulates both oncogenic Ras and the tumour suppressor p53 in colon cancer cells. *Mol. Med.*, Vol. 6, No. 8 (2000) 693-704
- Hancock, J.F.; Ras proteins: different signals from different locations. *Nature reviews – Molecular cell biology*, Vol.4 (2003) 373-384
- Heller, T., Trautmann, B., Zöller-Utz, I., König, H.J., Liebe, S., Ell, C., Löhr, M.; Restriktionsenzym-Mismatch-Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Ki-ras-Onkogen-Mutationen beim Pankreaskarzinom. *Dtsch. Med. Wschr.* 120 (1995) 826-830
- Hesketh, R. "The oncogene and tumour suppressor gene factsbook" Academic Press, San Diego – London, 1997, second edition
- Hruban, R.H., van Mansfeld, A.D.M., Offerhaus, G.J.A., van Weering, D.H.J., Allison, D.C., Goodman, S.N., Kensler, T.W., Bose, K.K., Cameron, J.L., Bos, J.L.; K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas – a study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *American Journal of Pathology*, Vol. 143, No. 2 (1993) 545-554
- Huber, K.R., Bittner, J., Bauer, K., Trümper, L., Sek, A., Sebesta, C., Rosen, H., Tragl, K.H.; Restriction digest PCR (RD-PCR) for the analysis of the gene mutations. Application to ki-ras. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36 (8) (1998) 593-595
- Hünerbein, M., Ghadimi, B.M., Bark, B., Schulz, H.-J., Schlag, P.M.; Verbesserte Pankreaskarzinomdiagnostik durch präoperative Ki-Ras Detektion im Pankreassekret. *Langenbecks Arch. Chir. I* (1997) Forumband 97-99
- Iguchi, H., Sugano, K., Fukayama, N., Ohkura, H., Sadamoto, K., Ohkoshi, K., Seo, Y., Tomoda, H., Funakoshi, A., Wakasugi, H.; Analysis of the Ki-ras codon 12 mutations in the duodenal juice of the patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 110 (1996) 221-226
- Imai, M., Hoshi, T., Ogawa, K.; K-ras codon 12 mutations in biliary tract tumors detected by the polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis. *Cancer*, Vol.73, No. 11 (1994) 2727-2733

- Jacobs, G., Tscholl, E., Sek, A., Pfreundschuh, M., Daus, H., Trümper, L.; Enrichment polymerase chain reaction for the detection of the ki-ras mutations: relevance of the Taq polymerase error rate, initial DNA copy number, and reaction conditions on the emergence of false-positive mutant bands. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125 (1999) 395-401
- Jiang, W., Kahn, S.M., Guillem, J.G., Lu, S.H., Weinstein, I.B.; Rapid detection of ras oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal and gastric cancer. *Oncogene* 4 (1989) 923-928
- Kahn S., Yamamoto F., Almoguera C., Winter E., Forrester K., Jordano J., Perucho M.; The c-K-ras gene and human cancer (review). *Anticancer research*, Vol. 7 (1987) 639-652
- Kondo, H., Sugano, K., Fukayama, N., Kyogoku, A., Nose, H., Shimada, K., Ohkura, H., Ohtsu, A., Yoshida, S., Shimosato, Y.; Detection of point mutations in the K-ras oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Cancer*, Vol. 73, No. 6 (1994) 1589-1594
- Lang, S.M., Heinzlmann, M., Stratakis, D.F., Teschauer, W., Loeschke, K.; Detection of Ki-ras mutations by PCR and differential hybridization and of p53 mutations by SSCP analysis in endoscopically obtained lavage solution from patients with long-standing ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology*, Vol.92, No. 12 (1997) 2166-2170
- Lemoine, N.R., Jain, S., Hughes, C.M., Staddon, S.L., Maillet, B.M., Hall, P.A., Klöpferl, G.; Ki-ras oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer. *Gastroenterology* 102 (1992) 230-236
- Levi, S., Urbano-Ispizua, A., Gill, R., Thomas D.M., Gilbertson, J., Foster, C., Marshall, C.J.; Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer research* 51 (1991) 3497-3502
- Lin, S.-Y., Chen, P.-H., Wang, C.-K., Liu, J.-D., Siau, C.-P., Chen, Y.-J., Yang, M.-J., Liu, M.-H., Chen, T.-C., Chang, J.-G.; Mutation analysis of the K-ras oncogenes in the gastroenterologic cancers by the amplified created restriction sites method. *A. J. C. P.*, Vol.100, No. 6 (1993) 686-689
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.; *Molecular Cell Biology*, 4<sup>th</sup> edition, W.H. Freeman and Company, New York, 2000, 871-879, 902-905, 1060 ff



- Lohr, M., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B.; K-ras mutations and benign pancreatic disease. *Int. J. Pancreatol.*, Vol. 27, No. 2 (2000) 93-103
- Longnecker, D.S., Memoli, V., Pettengill, O.S.; Recent results in animal models of pancreatic carcinoma: histogenesis of tumors. *Yale J. Biol. Med.*, Vol.65, No. 5 (1992) 457-464
- Luttgies, J., Diederichs, A., Menke, M.A., Vogel, I., Krmer, B., Klopperl, G.; Ductal lesions in patients with chronic pancreatitis show K-ras mutations in a frequency similar to that in the normal pancreas and lack nuclear immunoreactivity for p53. *Cancer*, Vol. 88, No. 11 (2000) 2495-2504
- Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N., Russo, A.; Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *Journal of cellular physiology*, Vol.192 (2002) 125-130
- Masson, P., Andrén-Sandberg, A.; Crude isolation of DNA from unselected human pancreatic tissue and amplification by the polymerase chain reaction of Ki-ras oncogene to detect point mutations in pancreatic cancer. *Oncologica*, Vol. 31, No.4 (1992) 421-424
- Matsubayashi, H., Watanabe, H., Nishikura, K., Ajioka, Y., Kijima, H., Saito, T.; Determination of pancreatic ductal carcinoma. *Cancer*, Vol.82, No.4 (1998) 651-659
- Matsubayashi, H., Watanabe, H., Yamaguchi, T., Ajioka, Y., Nishikura, K., Iwafuchi, M., Yamano, M., Kijima, H., Saito, T.; Multiple K-ras mutations in hyperplasia and carcinoma in cases of human pancreatic carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* (1999) 841-848
- Meltzer, S.J., Mane, S.M., Wood, P.K., Resau, J.H., Newkirk, C., Terzakis, J.A., Korelitz, B.I., Weinstein, W.M., Needleman, S.W.; Activation of c-Ki-ras in human gastrointestinal dysplasias determined by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Cancer Research* 50 (1990) 3627-3629
- Miki, H., Matsumoto, S., Harada, H., Mori, S., Haba, R., Ochi, K., Kobayashi, S., Ohmori, M.; Detection of c-Ki-ras point mutation from pancreatic juice. *International Journal of Pancreatol.*, Vol. 14, No. 2 (1993) 145-148
- Moore, P.S., Beghelli, S., Zamboni, G., Scarpa, A.; Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Molecular Cancer* (2003) 2-7
- Mora, J., Puig, P., Boadas, J., Urgell, E., Monserrat, E., Lerma, E., González-Sastre, F., Lluís, F., Farré, A., Capellá, G.; K-ras gene mutations in the diagnosis

of fine-needle aspirates of pancreatic masses: prospective study using two techniques with different detection limits. *Clinical Chemistry* 44, No.11 (1998) 2243-2248

- Motojima; K., Urano, T., Nagata, Y., Shiku, H., Tsurifune, T., Kanematsu, T.; Mutations in the Kirsten-ras oncogene are common but lack correlation with prognosis and tumor stage in human pancreatic carcinoma. *Am. J. Gastroenterology* (1991) 1784-1788
- Motojima; K., Urano, T., Nagata, Y., Shiku, H., Tsurifune, T., Kanematsu, T.; Detection of point mutations in the Kirsten-ras oncogene provides evidence for the multicentricity of pancreatic carcinoma. *Annals of Surgery*, Vol.217, No.2 (1993) 138-143
- Mulcahy, H.E., Lyautey, J., Lederrey, C., Chen, X.q., Anker, P., Alstead, E.M., Ballinger, A., Farthing, M.J.G., Stroun, M.; A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clinical Cancer Research*, Vol.4 (1998) 271-275
- Mulligan, N.J., Yang, S., Andry, C., Klein, M., O'Brien, M.J.; The role of p21<sup>ras</sup> in pancreatic neoplasia and chronic pancreatitis. *Human Pathology*, Vol.30, No.6 (1999) 602-610
- Murray, M.J., Shilo, B., Shih, C., Cowing, D., Hsu, H.W., Weinberg, R.A.; Three different human tumour cell lines contain different oncogenes. *Cell*, Vol. 25 (1981) 355-361
- Nagase, T., Kawata, S., Tamura, S., Matsuda, Y., Inui, Y., Yamasaki, E., Ito, T., Matsuzawa, Y.; Inhibition of cell growth of human hepatoma cell line (Hep G2) via a farnesyl protein transferase inhibitor: a preferential suppression of ras farnesylation. *Int. J. Cancer*, Vol.65, No.5 (1996) 620-626
- Newton, C.R., Graham, A.; „PCR“ , Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg , 1994
- Nollau, P., Jung, R., Neumaier, M., Wagener, C.; Tumour diagnosis by PCR-based detection of tumour cells. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (1995) 116-121
- Nollau, P., Moser, C., Weinland, G., Wagener, C.; Detection of K-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR. *Int. J. Cancer* 66 (1996) 332-336

- Orth, M., Gansauge, F., Gansauge, S., Beger, H.G., Adler, G., Schmid, R.M.; K-ras mutations at codon 12 are rare events in chronic pancreatitis. *Digestion* (1998) 120-124
- Pabst, B., Arps, S., Binmoeller, K., Thul, R., Walsemann, G., Fenner, C., Klapdor, R.; Analysis of K-ras mutations in pancreatic tissue after fine needle aspirates. *Anticancer Research* 19 (1999) 2481-2484
- Prevost, G.P., Pradines, A., Viosat, I., Brezak, M.C., Miquel, K., Lonchamp, M.O., Kasprzyk, P., Favre, G., Pignol, B., Le Breton, C., Dong, J., Morgan, B.; Inhibition of human tumor cell growth in vitro and in vivo by a specific inhibitor of human farnesyltransferase: BIM-46068. *Int. J. Cancer.*, Vol. 83, No. 2 (1999) 283-287
- Queneau, P.E., Adessi, G.L., Thibault, P., Cleau, D., Heyd, B., Manton, G., Carayon, P.; Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnosis utility of a K-ras point mutation in the pancreatic juice. *Am. J. Gastroenterology*, Vol. 96, No. 3 (2001) 700-704
- Rall, C.J.N., Rivera, J.A., Centeno, B.A., Fernandez-del Castillo, C., Rattner, D.W., Warshaw, A.L., Rustgi, A.K.; Peritoneal exfoliative cytology and Ki-ras mutational analysis in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer letters* 97 (1995) 203-211
- Rettig Emanuel, J., Damico, C., Ahn, S., Bautista, D., Costa, J.; Highly sensitive nonradioactive single-strand conformational polymorphism - Detection of Ki-ras mutations. *Diagnostic Molecular Pathology* 5(4) (1996) 260-264
- Roll, J., Boyer, J.L., Barry, D., Klatskin, G.; The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 308, No. 1 (1983) 1-7
- Santos, E., Nebreda, A.R.; Structural and functional properties of ras proteins. *The FASEB Journal*, Vol.3 (1989) 2151-2163
- Satoh, K., Shimosegawa, T., Moriizumi, S., Koizumi, M., Toyota, T.; K-ras mutation and p53 protein accumulation in intraductal mucin-hypersecreting neoplasms of the pancreas. *Pancreas*, Vol. 12, No.4 (1996) 362-368
- Schneider, G., Lersch, C., Schmid, R.M.; Karzinogenese des Pankreaskarzinoms. *Chirurg* 74 (2003) 165-170
- Shibata, D., Almoguera, C., Forrester, K., Dunitz, J., Martin, S.E., Cosgrove, M.M., Perucho, M., Arnheim, N.; Detection of c-K-ras-mutations in fine needle

- aspirates from human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Research* 50 (1990) 1279-1283
- Slamon, D.J., deKernion, J.B., Verma, I.M., Cline, M.J.; Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science*, Vol.224 (1984) 256-262
  - Song, M.-M., Nio, Y., Sato, Y., Tamura, K., Furuse, K.; Clinicopathological significance of Ki-ras point mutation and p21 expression in benign and malignant exocrine tuors of the human pancreas. *International Journal of Pancreatology*, Vol. 20, No. 2 (1996) 85-93
  - Sorenson, G.D., Pribish, D.M., Valone, F.H., Memoli, V.A., Bzik, D.J., Yao, S.L.; Soluble normal and mutant DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer E6pidemiol. Biomarkers Prev.* (1994) 67-71
  - Sturm, P.D.J., Hruban, R.H., Ramsoekh, T.B., Noorduyn, L.A., Tytgat, G.N., Gouma, D.J., Offerhaus, G.J.A.; The potential diagnostic use of K-ras codon 12 and p53 alterations in brush cytology from the pancreatic head region. *Journal of Pathology* 186 (1998) 247-253
  - Sugano, K., Kyogu, A., Fykayama, N., Ohkura, H., Shimosato, Sekiya, T., Hayashi, K.; Rapid and simple detection of c-Ki-ras2 gene codon 12 mutations by nonradioisotopic single.strand conformation polymorphism analysis. *Laboratory Investigation* (1993) 361-366
  - Tada, M., Ohashi, M., Shiratori, Y., Okudaira, T., Komatasu, Y., Kawabe, T., Yoshida, H., Machinami, R., Kishi, K., Omata, M.; Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. *Gastroenterology* 110 (1996) 227- 231
  - Tada, M., Omata, M., Kawai, S., Saisho, H., Ohto, M., Saiki, R.K., Sninsky, J.J.; Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research* 53 (1993) 2472-2474
  - Tada, M., Omata, M., Ohto, M.; Clinical application of ras gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 100 (1991) 233-238
  - Tada, M., Teratani, T., Komatsu, Y., Kawabe, T., Shiratori, Y., Omata, M.; Quantitative analysis of ras gene mutation in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Dig. Dis. Sci.*, Vol.43, No. 1 (1998) 15-20
  - Tada, M., Yokosuka, O., Omata, M., Ohto, M., Isono, K.; Analysis of Ras gene mutations in biliary and pancreatic tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Cancer*, Vol. 66, No.5 (1990) 930-935

- Takahashi, M., Chen, W., Byrd, D.R., Disi, M.L., Huseby, E.S., Qin, H., McCahill, L., Nelson, H., Shimada, H., Okuno, K.; Antibody to ras proteins in patients with colon cancer. *Clin. Cancer Research* (1995) 1071-1077
- Tamagawa, E., Ueda, M., Takahashi, S., Sugano, K., Uematsu, S., Mukai, M., Ogata, Y., Kitajima, M.; Pancreatic lymph nodal and plexus micrometastases detected by enriched polymerase chain reaction and nonradioisotopic single-strand conformation polymorphis analysis: a new predictive factor for recurrent pancreatic carcinoma. *Cli. Cancer Research* (1997) 2143-2149
- Theodor, L., Melzer, E., Sologov, M., Idelman, G., Friedman, E., Bar-Meir, S.; Detection of pancreatic carcinoma: diagnostic value of K-ras mutations in circulating DNA from serum. *Dig. Dis. Sci.* (1999) 2014-2019
- Tio, T.L., Reeders, W.A., Sie, L.H., Wijiers, O.B., Maas, J.J., Colin, E.M., Tytgat, G.N.J.; Endosonography in the clinical staging of klatskin tumor. *Endoscopy* 25 (1993) 81-85
- Trede, M., Schwall, G., Saeger, H.-D.; Survival after pancreatoduodenectomy. *Ann. Surgery* (1990) 447-458
- Trümper, L.H., Bürger, B., von Bonin, F., Hintze, A., von Blohn, G., Pfreundschuh, M., Daus, H.; Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by polymerase chain reaction from pancreatic secretions. *Br. J. Cancer* 70 (1994) 278-284
- Van Laethem, J-L.; Ki-ras mutations in chronic pancreatitis: which dicriminating ability for malignant potential . *Ann.N.Y.Acad. Sci.* 30 (1999) 210-218
- Van Laethem, J-L., Vertongen, P., Deviere, J., Van Rampelbergh, J., Rickaert, F., Cremer, M., Robberecht, P.; Detection of c-Ki-ras gene codon 12 mutations from pancreatic duct brushings in the diagnosis of the pancreatic tumours. *Gut* (1995) 781-787 (in Selected Summaries. *Gastroenterology* 110 (1996) 311-317)
- Verbeek, P.C.M., van Leeuwen, D.J., de Wit, L.T., Reeders, J.W.A.J., Smits, N.J., Bosma, A., Huibregtse, K., van der Heyde, M.N.; Benign fibrosing disease at the hepatic confluence mimicking Klatskin tumors. *Surgery* (1991) 866-871
- Warshaw, A.L., Fernández-Del Castillo, C.; Pancreatic carcinoma, review article. *The New England Journal of Medicine* Vol.326, No.7 (1992) 455-465
- Rettig Emanuel, J., Damico, C., Ahn, S., Bautista, D., Costa, J.; Highly sensitive nonradioactive single-strand conformational polymorphism- Detection of Ki-ras mutations. *Diagnostic Molecular Pathology* 5(4) (1996) 260-264

- Watanabe, M., Asaka, M., Tanaka, J., Kurosawa, M., Kasai, M., Miyazaki, T.; Point mutation of K-ras gene codon 12 in biliary tract tumors. *Gastroenterology* 107 (1994) 1147-1153
- Watanabe, H., Sawabu, N., Songür, Y., Yamaguchi, Y., Yamakawa, O., Satomura, Y., Ohta, H., Motoo, Y., Okai, T., Wakabayashi, T.; Detection of K-ras point mutations at codon 12 in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by PCR-RFLP analysis. *Pancreas*, Vol. 12, No. 1 (1996)18-24
- Weeks, G., Spiegelmann, G.B.; Roles played by ras subfamily proteins in the cell and developmental biology of microorganisms. *Cellular Signaling*, 15 (2003) 901-909
- Wilentz, R.E., Chung, C.H., Sturm, P.D.J., Musler, A., Sohn, T.A., Offerhaus, G.J.A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., Slebos, R.J.C.; K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer*, Vol. 82, No. 1 (1998) 96-103
- Yanagisawa, A., Ohtake, K., Ohashi, K., Hori, M., Kitagawa, T., Sugano, H., Kato, Y.; Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Research* 53 (1993) 953-956

## 8 Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
APS	Amoniumpersulfat
AS	Antisense
ATP	Adenosintriophosphat
BLASTN	Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides
Bp	Basenpaare
Bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cGMP	zyklisches Guanidinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosintriophosphat
dGTP	Desoxyadenosintriophosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriophosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Natrium-ethylendiamin-N,N,N',N-tetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
g	Graviditätskonstante
G	Guanin
Gal	Galaktose
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GEF	Guaninnucleotid-Austauschfaktor
GTP	Guanosintriophosphat
HEPES	Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethan-sulfonsäure

IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani
M	Mol
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
μg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimol
μM	Mikromol
mRNA	messenger RNA
nt	Nukleotid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PH	negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRE	serum response element
SRF	serum response factor
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCF	ternary complex factor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamid
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur



Tris	Tris(hydroxy)aminomethan
U	Uracil
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-fructopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1/S.7 : Umwandlung der inaktiven GDP-haltigen Form des Ras-Proteins in die aktive Form

Abbildung 2/S.8: Schemazeichnung Kinase-Kaskade

Abbildung 3/S.9: RTK-Ras-Signalweg

Abbildung 4/S.15: Schemazeichnung nested-PCR nach Levi

Abbildung 5/S.40: Vektorkarte pT7 Blue

Abbildung 6/S.44: Verdünnungsreihen von SW 480 im Blut gesunder Patienten

Abbildung 7/S.46: Veränderung der PCR-Ergebnisse nach zusätzlichem Verdau

Abbildung 8/S.47: PCR-Resultat nach doppelter BstN1-Menge, Verdauzeit 7h

Abbildung 9/S. 48: PCR der Zelllinien

Abbildung 10/S.50:Schema Verdau-Versuch

Abbildung 11/S.52:Austestung der optimalen dNTP- + Mg-Konzentration

Abbildung 12/S.54:Sensitivität mit PCR-Version II

## 10 Anhang

EDTA-Lösung: 0,2 M ; pH 7,0

7,44 g EDTA + 100 ml Aqua dest.

Tris-HCl: 1,0 M ; pH 8,02

12,11 g Tris + 100 ml Aqua dest.

dNTP: je 10 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP => 40 µl ; 25 mM

40 ml dNTPs + 360 µl TE-Puffer => 400 µl dNTP ; 2,5 mM

TE-Lösung einfach:

10 mM Tris-HCl ( pH 8,0)

1 mM EDTA ( pH 8,0)

Nukleid-Lysis-Puffer:

25 ml EDTA + 5 ml Tris-HCl + 15 ml NaCl

=> mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen, mit HCl auf pH 8,2 einstellen

Upper-Primer ( sense):

Primer 1s

5'- ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT -3' (Endres)

Primer 2s

5'-ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CC-3'

Primer 3s

5'- ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA C-3'

Primer KR s 1s

5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT -3'

Primer MSP-1

5'-AAA CTT GTG GTA GTT GGA GCC-3'

Primer MSP-2

5'-ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA GCC-3'

Lower Primer (antisense):

Primer 2a

5'- TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC-3' (Endres)

Primer s 3a

5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC GAC TAA AAC AAG ATT TAC CTC -3'

Primer 3a

5'- TAA TAT GTC GAC TAA AAC AAG ATT TAC CTC-3' (Endres)

Primer k 4r

5'- TAA TAT GCA TAT TAA AAC AAG ATT TAC CTC -3'

Primer s 4a

5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC TAT TAA AAC AAG ATT TAC CTC -3'

Primer 2 WT

5'- TCA AAG AAT GGT CCT GCA CC-3'

## 11 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die beim Erstellen dieser Arbeit geholfen haben:

Herrn Professor Dr. R. M. Schmid für die Übernahme der Dissertation, kompetente Unterstützung und hilfreiche Diskussion des Themas.

Herrn Professor Dr. Dres. h.c. mult. M. Classen für die Arbeitsmöglichkeit und Bereitstellung der technischen Einrichtungen an seinem Lehrstuhl.

Herrn Dr. H. Salmhofer für das Überlassen des Dissertationsthemas, die ausgezeichnete Betreuung und stete Unterstützung bei fachlichen und strukturellen Problemen .

Frau Dipl. Biol. B. Seidler für die effiziente Mitarbeit und zahlreichen Anregungen, die entscheidend zum Gelingen des Projektes beigetragen haben.

Frau Dr. N. Endres, Herrn Dr. D. Saur und Frau M. Werb für die tatkräftige Unterstützung in fachlichen und organisatorischen Fragen.

Frau Dr. I. Becker und den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie für die fachspezifische Beratung und Bereitstellung der Gewebeproben.

Frau E. Wettschureck, durch deren engagiertes Mitwirken eine große Probenzahl erreicht werden konnte.

Den Mitarbeitern der II. Medizinischen Klinik für die kollegiale Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die zahlreichen anregenden Diskussionen.

Allen Freunden und Bekannten, sowie meiner Familie, die mich die ganze Zeit über unterstützt haben und mir bei Fragen und Problemen jeder Art mit Rat und Tat zur Seite standen.

## 12 Lebenslauf

Name Martina Mayr  
Geb. 20.09.1974  
Geburtsort Augsburg

Schulbildung 1980 - 1984 Grundschule Mering  
1984 - 1993 Gymnasium Friedberg

Studium 1993 - 2000 Medizinstudium TU München

Examina Ärztliche Vorprüfung August 1995  
1. Abschnitt der ärztl. Prüfung August 1996  
2. Abschnitt der ärztl. Prüfung August 1999  
3. Abschnitt der ärztl. Prüfung November 2000

Famulaturen März 1996 Abteilung für Innere Medizin Kreiskrankenhaus Mering  
September-November 1996 Abtlg. für Innere Medizin KKH Mering  
April 1996 Pathologisches Institut TU München, Klinikum r.d.Isar  
März 1997 Kinderklinik/Poliklinik der TU München,  
Städt. Kinderkrankenhaus München-Schwabing

Ausbildung im PJ Oktober 1999 bis September 2000:

- Unfallchirurgische Abteilung am Klinikum rechts der Isar
- Chirurgische Klinik und Poliklinik am rechts der Isar
- Institut für Anästhesie am Klinikum rechts der Isar
- Abteilung für Innere Medizin am Klinikum rechts der Isar

Wissenschaftliche Tätigkeit

ab 1996 Promotion im Labor für Immunologie der II. Med.Klinik,  
Klinikum rechts der Isar unter der Leitung von Professor Dr.  
M.Classen

2001 Einfluß von Heparinen auf die Tumorzelladhäsion,  
Regulation von Interleukin 10- Rezeptoren bei Sepsis

Berufliche Tätigkeit Januar 2001 bis Juni 2002 AiP, II.Med. Klinik, Klinikum r.d.Isar  
ab Juli 2002 Assistenzärztin, II. Med.Klinik, Klinikum r.d.Isar