

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und
Onkologie am Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Hochsensitive Mutationsanalyse des K-ras-
Protoonkogens im peripheren Blut von Patienten mit
akuter myeloischer Leukämie mittels quantitativer PCR**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Roman Preston

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. H. Oettle
 2. Priv.-Doz. Dr. med. D. Lüftner
 3. Prof. Dr. med. F.-W. Busch

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines	1
1.2	Klinische Symptomatik	1
1.3	Epidemiologie	2
1.4	Ätiologie	2
1.5	Molekulare Genetik	4
1.6	Diagnostik	9
1.6.1	Zytologische Diagnostik	9
1.7	Klassifikationen nach FAB und WHO	10
1.8	Prognostische Faktoren	12
1.9	Therapie der AML	13
2	Herleitung der Fragestellung	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Chemikalien	17
3.1.2	Enzyme	18
3.1.3	Puffer und Lösungen	18
3.1.4	Medien	19
3.1.5	Zelllinien	19
3.1.6	Kits zur DNA-Präparation	19
3.1.7	Kit zur Klonierung	19
3.1.8	Oligonukleotide	19
3.1.9	Geräte	20
3.1.10	Verbrauchsmaterialien	21
3.2	Methoden	22
3.2.1	Leukozytenanreicherung aus Vollblut	22
3.2.2	Isolierung genomischer DNA	22
3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese der präparierten DNA	22
3.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA	23
3.2.5	Quantitative PCR im LightCycler®	23
3.2.5.1	Prinzip der LightCycler®-Technologie	23
3.2.5.2	Quantitative PCR-Analyse mit Hilfe von Hybridisierungssonden	23
3.2.5.3	Selektive Detektion der mutierten Allele	24
3.2.5.4	Quantitativ-PCR-Protokolle	25
3.2.6	Enriched BstNI RFLP / PCR	28
3.2.7	Klonierung	30
3.2.7.1	Amplifikation des K-ras-Gens	31
3.2.7.2	Ligation des PCR-Produktes mit dem Klonierungsvektor	32
3.2.7.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	32
3.2.7.4	Ausplattieren und Selektion der Bakterien	33
3.2.7.5	Isolation der Plasmid-DNA	33
3.2.7.6	Untersuchung der Plasmid-DNA im Spektralphotometer	33
3.2.7.7	Restriktionsverdau der Plasmide	33
3.2.7.8	Mutationsanalyse der Klone	34
3.2.8	Statistische Auswertung	34

4	Ergebnisse	35
4.1	Methodenbezogene Ergebnisse	35
4.1.1	Optimierung der quantitativen PCR im LightCycler®	35
4.1.1.1	Unterdrückung der Wildtypallel-Fluoreszenz durch PNA	35
4.1.1.2	Primer	39
4.1.1.3	MgCl ₂ -Konzentration	40
4.1.2	Sensitivität der optimierten quantitativen PCR	42
4.1.3	Variabilität der sequenzabhängigen Schmelztemperaturen	47
4.1.4	Nachweis von K-ras-Mutationen mit einer etablierten Methode: Enriched BstNI RFLP / PCR	47
4.2	Patientenbezogene Ergebnisse	49
4.2.1	Basisdaten der untersuchten Patienten	49
4.2.2	Nachweis von K-ras-Mutationen im Blut	52
4.2.3	Statistische Auswertung zur klinischen Relevanz des K-ras- Mutationsnachweises	57
5	Diskussion	60
5.1	Methodik der K-ras-Mutationsanalyse	60
5.2	Nachweis von K-ras-Mutationen bei AML-Patienten	65
5.3	Ausblick	70
6	Zusammenfassung	72
7	Literaturverzeichnis	74
8	Anhang	83
8.1	Abkürzungsverzeichnis	83
8.2	Danksagung	86
8.3	Eigenständigkeitserklärung	87
8.4	Lebenslauf	88

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Der Begriff „Leukämie“ (griechisch: „Weißes Blut“) wurde Mitte des 19. Jahrhunderts von Rudolf Virchow geprägt. Er beschreibt die exzessive Vermehrung von Leukozyten, die Virchow bei Patienten mit Fieber, Schwäche und Vergrößerung von Leber und Milz beobachtete [1].

Leukämien sind neoplastische Erkrankungen, die durch maligne Transformation hämatopoetischer Zellen entstehen. Dabei kommt es zu einer autonomen Proliferation des malignen Stammzellklons und zur Akkumulation der neoplastischen Zellen primär im Knochenmark, meist auch im Blut und in lymphatischen Geweben, seltener in anderen Organen. Das gesunde Knochenmark wird verdrängt, was zu Störungen der normalen Blutbildung mit progredienter Anämie, Thrombo- und Granulozytopenie führt [2].

Die Einteilung der Leukämien erfolgt nach dem klinischen Verlauf in akute und chronische Leukämien, sowie nach morphologischen, zytochemischen und immunzytologischen Kriterien der atypischen Zellen in myeloische und lymphatische Leukämien und Untergruppen. Nach der Leukämiezellzahl im Blut unterscheidet man leukämische, sub- und aleukämische Verlaufsformen.

Der akuten myeloischen Leukämie (AML) liegt die unkontrollierte Proliferation differenzierungsgestörter myeloischer Stamm- und Vorläuferzellen zugrunde.

1.2 Klinische Symptomatik

Die vielfältigen und oft unspezifischen klinischen Symptome der AML sind in Vielzahl Folge der Knochenmarkinfiltration durch die leukämischen Zellen. Die Verdrängung der normalen Hämatopoese führt zu einer erhöhten Infektanfälligkeit, zu hämorrhagischer Diathese mit Petechien, Epistaxis und Zahnfleischbluten, sowie zu progredienten Anämiesymptomen wie Blässe, Schwäche, Abgeschlagenheit und Dyspnoe. Hinzu kommen Symptome durch unterschiedlich ausgeprägten Organbefall wie Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Knochenschmerzen und leukämische Hautinfiltrationen. Durch Befall des zentralen Nervensystems kann es zu unterschiedlichen neurologischen Symptomen kommen. Bei Hyperleukozytose mit

mehr als 100.000 leukämischen Zellen pro Mikroliter Blut kann es durch Gefäßokklusionen zu zerebrovaskulären Durchblutungsstörungen oder Blutungen kommen. AML-Patienten klagen außerdem häufig über Nachtschweiß und Gewichtsverlust [3;4].

1.3 Epidemiologie

Leukämien sind in Deutschland die neunthäufigste Krebstodesursache bei Männern. In den alten Bundesländern liegen Leukämien bei Frauen in der Statistik der häufigsten Krebstodesursachen ebenfalls auf dem neunten, in den neuen Bundesländern sogar auf dem siebten Platz. Ihr Anteil an der Gesamtkrebssterblichkeit liegt bei etwa 3 %. Die Neuerkrankungsraten der Leukämien sind nach Daten des Krebsregisters der ehemaligen DDR seit den 1970er Jahren etwa konstant geblieben [2].

Die AML ist mit etwa 80 % die häufigste Form der akuten Leukämie im Erwachsenenalter. Bei Kindern beträgt der Anteil der AML an den akuten Leukämien ca. 15-20 % [2]. Die Gesamtinzidenz beträgt 2,4 / 100.000 Personen / Jahr, sie ist jedoch stark altersabhängig. Ab einem Alter von 45 Jahren steigt sie steil an und liegt in der Population der 70-jährigen bei 15, bei 90-jährigen bei 35 / 100.000 / Jahr. Das mittlere Alter bei der Diagnosestellung beträgt 63 Jahre [2;3].

Die Inzidenz der AML zeigt auch geographische Unterschiede. Die Häufigkeit der Erkrankung ist in Westeuropa, Nordamerika und Ozeanien am höchsten, in Asien und Lateinamerika am niedrigsten [2]. Dies kann teilweise durch unterschiedliche Diagnosegenauigkeit und Unterschiede in der Erfassung der epidemiologischen Daten erklärt werden.

1.4 Ätiologie

Die Blutbildung ist ein dynamischer, durch das Zusammenspiel verschiedener Transkriptions- und Wachstumsfaktoren hochgradig regulierter Prozess. Die AML entsteht als Resultat einer Reihe von genetischen Veränderungen in den hämatopoetischen Progenitorzellen. Gene, die die normale Blutbildung regulieren, sind von den hierbei auftretenden Mutationen betroffen, so dass ihre Kontrollfunktion über die Hämatopoese verloren geht. Dabei verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Differenzierung in reife hämatopoetische Zellen.

Gene, die für Zellproliferation und -überleben verantwortlich sind, bleiben in ihrer Funktion erhalten oder werden verstärkt aktiviert. Eine starke Vermehrung der entarteten Zellen resultiert in einer Ansammlung atypischer, funktionell gestörter myeloischer Zellen, die im Knochenmark akkumulieren und in das periphere Blut und andere Organsysteme ausgeschwemmt werden.

Es ist umstritten, ob der Entstehung einer AML immer die leukämische Transformation einer bestimmten primitiven multipotenten Zelle zugrunde liegt oder ob die Erkrankung von verschiedenen Zelltypen innerhalb der Vorläuferzellhierarchie ausgehen kann [2].

Bei den meisten AML-Patienten können keine Kontakte mit Karzinogenen, ionisierender Strahlung oder anderen Risikofaktoren ausgemacht werden, mit denen die Entstehung der Leukämie in Zusammenhang gebracht werden kann. In diesen Fällen spricht man von einer primären AML. Eine sekundäre AML kann sich aus einem myelodysplastischen Syndrom (MDS), nach Strahlenexposition oder nach Kontakt mit karzinogenen Substanzen entwickeln, z. B. nach Radio- oder Chemotherapie einer anderen malignen Erkrankung. Beispielsweise erkranken 3-10 % der Patienten an AML, die im Rahmen der Therapie von Lymphomen, Multiplem Myelom, Ovarial- oder Mammatumoren mit alkylierenden Substanzen behandelt wurden. Im Mittel entwickeln diese Patienten die Leukämie 5-10 Jahre nach Beginn der Chemotherapie [3;5]. Weitere Noxen, die die hämatologischen Progenitorzellen im Knochenmark schädigen, sind Benzol und dessen Derivate, Ethylenoxide, Pestizide und einige organische Lösungsmittel. Eine berufsbedingte Exposition gegenüber diesen Stoffen erhöht das Risiko an einer AML zu erkranken auf etwa das Zweifache im Vergleich zu einer nichtexponierten Person [2;6;7]. Der Zusammenhang zwischen Leukämien und radioaktiver Strahlung gilt ebenfalls als bewiesen. Nach den Atombombenabwürfen über Hiroshima und Nagasaki stieg die Inzidenz der AML mit einer Latenz von 5-21 Jahren an, in Hiroshima wuchs die Krankheitshäufigkeit auf das 30-fache an. Das Erkrankungsrisiko war abhängig vom Alter der Betroffenen sowie von der Strahlendosis [8]. Auch zur medizinischen Diagnostik oder Therapie eingesetzte ionisierende Strahlung erhöht das Risiko, an einer AML zu erkranken: Die Radiotherapie eines Morbus Hodgkin stellt einen vom Lebensalter abhängigen Risikofaktor für das Entstehen einer AML dar, besonders bei einer Strahlendosis von mehr als 20 Gy [9;10]. Inwieweit sich bei kombinierter

Anwendung Strahlen- und Chemotherapie als Risikofaktoren beeinflussen, wird kontrovers diskutiert [11-13]. Bestimmte genetische Erkrankungen wie die Trisomie 21 oder das Klinefelter-Syndrom erhöhen das Risiko, an einer AML zu erkranken. Neben dem oben genannten MDS sind auch andere hämatologische Erkrankungen wie Polycythämia vera und in geringerem Maße die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie ebenfalls Risikofaktoren für die Entstehung einer AML [2;3].

1.5 Molekulare Genetik

In den malignen Zellen von Leukämiepatienten werden zahlreiche klonale Veränderungen des genetischen Materials gefunden. Hierbei handelt es sich sowohl um chromosomale Translokationen, die mittels zytogenetischer Methoden zu erkennen sind, als auch um kleinere Veränderungen, bis hin zu Punktmutationen einzelner Gene, die nur molekularbiologisch nachweisbar sind.

Man unterscheidet aktivierende Mutationen (Klasse-I-Mutationen), die zu einer verstärkten Proliferation führen oder Einfluss auf das Zellüberleben nehmen, und differenzierungshemmende Mutationen (Klasse-II-Mutationen), die durch Veränderung von Transkriptionsfaktoren oder anderen an der Gentranskription beteiligten Gene ausgelöst werden [14]. Es wird davon ausgegangen, dass eine Akkumulation mehrerer Klasse-I- und Klasse-II-Mutationen zur leukämischen Transformation des betroffenen Zellklons führt [15].

Auf verschiedene genetische Veränderungen, die in den malignen Zellen von Patienten mit AML gefunden werden, wird im Folgenden eingegangen. Besonderes Gewicht liegt hierbei auf den Ras-Mutationen. Weitere mit der AML assoziierte Mutationen werden im Anschluss beschrieben.

Mutationen in den Ras-Genen gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen in soliden Tumoren und bei malignen hämatologischen Erkrankungen [16]. Zur humanen Ras-Genfamilie gehören die drei Gene Kirsten-Ras (K-ras), Harvey-Ras (H-ras) sowie N-ras, das in einer Neuroblastom-Zelllinie erstbeschrieben wurde [16]. Diese Gene kodieren für homologe 21 kDa-Proteine. Inaktive Ras-Vorläufermoleküle werden durch kovalente Angliederung einer Farnesylgruppe (15-Carbon-Isoprenylgruppe) an ein C-terminales Cystein (Aminosäure 186) posttranslational modifiziert. Diese Reaktion wird durch das Enzym Farnesyltransferase katalysiert. Die Farnesylgruppe vermittelt die Assoziation des

Ras-Proteins an die Plasmamembran, die eine Voraussetzung für dessen regelrechte Funktion ist. Ras-Proteine sind GTP-bindende Proteine, die an der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden durch Rezeptoren beteiligt sind. Bei der Bindung an GDP sind Ras-Proteine inaktiv, in GTP-gebundener Form kommt es zur Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege. Guanin-Austauschfaktoren aktivieren Ras durch Bindung an GTP. GTPase-Aktivatoren führen zur GTP-Hydrolyse und zur inaktiven GDP-gebundenen Form von Ras. GTP-gebundenes Ras setzt Kaskaden wie die MAP-Kinase/ERK- oder PI3-Kinase-Signalwege in Gang, die zu Proliferation, Zelldifferenzierung und Schutz vor Apoptose führen [16;17]. Störungen der Regulation von Ras oder Mutationen, die zu einem dauerhaft aktiven Ras-Protein führen, können zu unkontrollierter Zellproliferation und verminderter Apoptose führen [17].

Mutationen in den Proto-Onkogenen K-ras, H-ras und N-ras betreffen meist Kodon 12, 13 oder 61 und damit Stellen, die für die Regulation der Aktivität des Ras-Proteins von Bedeutung sind. Diese Mutationen führen zu einer dauerhaften Aktivität von Ras [17]. Die höchsten Inzidenzen von Ras-Mutationen unter den soliden Tumoren zeigen Karzinome von Pankreas (>80 %), Schilddrüse (50-80 %) und Kolon (40-50 %) [16;18]. Bei malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems sind Ras-Mutationen in unterschiedlicher Frequenz nachzuweisen; die AML zeigt eine Inzidenz von Ras-Mutationen in 25-44 % der Fälle [16]. Die Mutationen können bei der AML in allen Ras-Genen auftreten. In einem Knochenmark-Transplantationsmodell der Maus zeigen die drei Ras-Gene das Potential zur Induktion myeloischer Leukämien, unterscheiden sich jedoch in der Stärke dieses Potentials [19]. In den meisten Fällen humaner AML sind bei Ras-Mutationen N-ras oder K-ras betroffen; H-ras-Mutationen werden nur selten gefunden [15-17;20]. Die Mutationen betreffen am häufigsten Kodon 12 [20]. Es ist nicht abschließend geklärt, ob das Auftreten von Ras-Mutationen bei der AML ein frühes oder spätes Ereignis während der Krankheitsentstehung ist. Dass eine Ras-Mutation nicht immer bei allen Blasten einer leukämischen Population nachweisbar ist, spricht für eine Akquisition der Mutation erst bei Krankheitsprogression. [21;22]. Andererseits werden schon in präleukämischen klonalen Zellen beim MDS Ras-Mutationen nachgewiesen, und die Mutation wird mit der leukämischen Transformation in Verbindung gebracht [23;24].

Eine interessante Frage ist, ob bei sekundären Leukämien die Ras-Mutationen in Folge der vorausgegangenen Chemotherapie, Giftstoffexposition oder radioaktiven Strahlung entstanden sind. Eine Fall-Kontroll-Studie zeigt, dass AML-Patienten mit Ras-Mutationen häufiger eine berufsbedingte Exposition gegenüber karzinogenen Substanzen angaben als solche ohne Ras-Mutationen [25]. Eine weitere Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen akuter lymphatischer Leukämie bei Kindern und der Belastung der Eltern mit potentiellen Karzinogenen während und nach der Schwangerschaft [26]. Die Studie beschreibt eine Assoziation zwischen elterlicher Exposition und N-ras- bzw. K-ras-Mutationen bei der Leukämie.

Die prognostische Bedeutung von Mutationen in den Ras-Genen bei AML ist umstritten. Die meisten Studien beschreiben keinen Einfluss von Ras-Mutationen auf die Prognose [27-32]. Andere Autoren konnten einen günstigen prognostischen Einfluss von Ras-Mutationen zumindest in Subgruppen erkennen [33;34]. Auch negative Einflüsse von mutierten Ras-Genen auf Remissionsrate und krankheitsfreies bzw. Gesamt-Überleben wurden beschrieben. [35;36]. Illmer und Mitarbeiter fanden zwar nicht Ras-Mutationen, aber eine erhöhte Ras-Aktivität als prognostisch günstigen Faktor bezüglich Therapieansprechen und Gesamt-Überleben bei AML-Patienten mit einem Alter unter 61 Jahren [37].

Eine eindeutige Assoziation von Mutationen der Ras-Gene zu bestimmten Subtypen der AML (Einteilung der AML nach FAB-Kriterien, siehe Abschnitt 1.7) oder zytogenetischen Merkmalen ist in der Zusammenschau der Literatur nicht gegeben; teilweise werden in Analysen Ras-Mutationen tendenziell häufiger bei dem FAB-Subtyp M4 bzw. bei normalem Karyotyp gefunden [27;29-32;34;37-41].

Ein therapeutischer Ansatz besteht in der Inhibierung der Farnesylierungsreaktion, da hierdurch die Membranlokalisation des Ras-Proteins und damit die Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden verhindert wird. Farnesyltransferase-Inhibitoren blockieren effektiv die Modifizierungsreaktion bei H-ras. K-ras kann jedoch alternativ auch durch die Geranylgeranylproteintransferase aktiviert werden, so dass der Effekt auf K-ras potentiell geringer ist [16]. In bisher veröffentlichten Untersuchungen zeigen die Farnesyltransferase-Inhibitoren günstige Toxizitätsprofile. Der Farnesyltransferase-Inhibitor Tipifarnib (R115777) wurde in einigen Studien in der AML-Therapie bei Patienten mit schlechtem Risikoprofil eingesetzt. Die Patienten zeigten in 23-30 % ein Therapieansprechen und scheinen auch von einer Erhaltungstherapie mit Tipifarnib zu profitieren [42-46].

Translokationen, die Gene des Core-binding factors (CBF) miteinbeziehen, werden in etwa 15 % aller AML Patienten gefunden und sind prognostisch günstig [15]. Der CBF-Komplex ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit, die von den Genen CBF α (Synonyme: AML1, RUNX1) und CBF β kodiert werden. CBF reguliert die Expression bestimmter für die normale Hämatopoese wichtiger Gene wie GM-CSF, Interleukin-1 und -3 und spielt somit eine wichtige Rolle bei der hämatopoetischen Differenzierung und Zellreifung. Translokationen im Bereich der an CBF beteiligten Gene führen zur Bildung verschiedener Fusionsproteine, die dominant einen Funktionsverlust von CBF als Transkriptionsfaktor im Sinne der hämatopoetischen Differenzierung zur Folge haben [47]. Häufige bei der AML vorkommende Translokationen unter Einbeziehung der CBF-Gene sind t(8;21), inv(16) und t(12;21). Hierbei kommt es zur Bildung der Fusionsgene AML1-ETO bzw. CBF β -MYH11 und TEL-AML1.

Mutationen im FLT3-Gen werden bei etwa 35 % aller Patienten mit AML gefunden [15]. Das FLT3-Gen kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase. Durch die Mutation kommt es zur Autophosphorylierung dieser Kinase und über verschiedene Signalwege (STAT-5, RAS/MAP-Kinase, PI3-Kinase) zu einer Stimulation der Zellproliferation und Apoptosehemmung [48;49].

Die häufigsten FLT3-Genveränderungen sind interne Tandem-Duplikationen (ITD) der juxtamembranären Domäne, die 1996 von Nakao und Mitarbeitern erstbeschrieben und mit der Pathogenese der AML in Verbindung gebracht wurden [50]. FLT3-ITD sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. Sie sind häufiger bei älteren Patienten als bei Kindern mit AML nachzuweisen, die Häufigkeit liegt insgesamt bei 24% aller Erkrankungsfälle [51]. FLT3-ITD werden bei allen FAB-Subtypen gefunden, jedoch überdurchschnittlich häufig beim M3- und seltener beim M2-Subtyp. Neben ITD werden auch Substitutionen im FLT3-Gen nachgewiesen.

Auch in der Tyrosinkinase c-Kit, die ebenfalls bei der Hämatopoese eine Rolle spielt, wurden bei AML-Patienten Mutationen gefunden; die Auswirkungen sind ähnlich wie bei FLT3-Mutationen [51].

Mutationen im Nucleophosmin-Gen NPM1 sind häufig (46-62 %) bei AML mit normalem Karyotyp [52;53]. Nucleophosmin ist ein nukleo-zytoplasmatisches Shuttle-

Protein und wird hauptsächlich im Zellkern nachgewiesen. Das Protein ist in den antineoplastischen ARF-p53-Signalweg involviert. NMP1-Mutationen führen zu einer gestörten Struktur von Nucleophosmin und zu einer veränderten Lokalisation im Zytoplasma, wodurch die tumorsuppressive Funktion beeinträchtigt ist. Nucleophosmin-Mutationen sind mit normalem Karyotyp und gutem Therapieansprechen assoziiert [52].

Bei der akuten Promyelozyten-Leukämie (AML M3) liegt in den meisten Fällen die Translokation t(15;17) vor, die zur Bildung des PML-RAR α -Fusionsgens führt. RAR α ist ein Transkriptionsfaktor, der in Anwesenheit von Retinolsäure differenzierungsfördernde Gene aktiviert und bei der normalen Hämatopoese wachstumshemmend wirkt. Das durch die Mutation entstehende Fusionsprotein PML-RAR α inhibiert die Funktion des RAR α -Wildtyps durch Bindung eines Ko-Repressors und führt zu einem Differenzierungsstopp der Zellen im Promyelozyten-Stadium. Therapeutisch wird bei Patienten zusätzlich zur Chemotherapie all-trans-Retinolsäure (ATRA) eingesetzt, wodurch diese Bindung gelöst und die weitere Differenzierung der Zellen wieder ermöglicht wird [47]. Die Prognose hinsichtlich Therapieansprechen und rezidivfreiem Intervall sind gut. [4]

Veränderungen des MLL-Gens (mixed-lineage leukemia) auf der Bande 11q23 kommen bei akuter lymphatischer und akuter myeloischer Leukämie vor. Auch MLL ist an der Regulation der Genexpression beteiligt. Bei der AML sind bis dato 65 unterschiedliche Chromosomenregionen als Fusionspartner des MLL-Gens beschrieben worden [54]. Translokationen mit Beteiligung der Bande 11q23 werden oft als prognostisch ungünstig eingeordnet, die Daten sind jedoch uneinheitlich [4]. MLL-Fusionsgene sind mit vorausgegangener Therapie mit Topoisomerase-II-Inhibitoren und dem FAB-Subtyp M5a assoziiert. Bei AML-Patienten werden auch Veränderungen innerhalb des MLL-Gens wie Tandemduplikationen gefunden.

Die HOX-Transkriptionsfaktoren sind Teile eines komplexen Netzwerks, das eine wichtige Rolle bei der Regulation der Hämatopoese spielt. Einige mit der AML assoziierte Translokationen wie t(7;11) und t(2;11) betreffen Gene der HOX-Familie, wobei es auch hier zur Fusion mit anderen Genen kommt. Die Expression vieler

HOX-Gene ist bei der AML verändert, wobei eine Überexpression von HOX-Genen vielfach mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [55].

CBP und p300 sind Transkriptions-Koaktivatoren, die eine Vermittlerfunktion zwischen Transkriptionsfaktoren und dem Transkriptionsapparat haben. Verschiedene AML-assoziierte Translokationen wie t(8;16), t(11;16) und t(11;22) führen zu CBP- bzw. p300-Fusionsgenen; eine Störung der hämatopoetischen Differenzierung ist die Folge [51].

Auch Mutationen des Transkriptionsfaktors CEBP α , der die Differenzierung von Zellen der granulozytären Reihe reguliert, sind bei der AML beschrieben. Sie sind mit einer guten Prognose assoziiert [15;53].

1.6 Diagnostik

Im Regelfall wird die Verdachtsdiagnose der akuten Leukämie anhand der klinischen Symptomatik (siehe 1.2) und Blutbildveränderungen gestellt. Beim Hinweis auf eine AML werden Knochenmarkuntersuchungen (Aspiration, Stanzbiopsie) zur Diagnosesicherung durchgeführt. Zusätzlich sollte beim Vorliegen einer AML umfangreiche weitere Diagnostik durchgeführt werden, die für eine optimale supportive Therapie notwendig ist. Hierzu zählen umfassende Laboruntersuchungen einschließlich Infektionsserologien, Blutgruppenbestimmung, Röntgendiagnostik des Thorax und der Nasennebenhöhlen, Abdomen-Sonographie, Echokardiographie, EKG, Lungenfunktionsprüfung, sowie für eine spätere allogene Knochenmarktransplantation HLA-Typisierung des Patienten und seiner Angehörigen [4]

1.6.1 Zytologische Diagnostik

Zur zytomorphologischen Beurteilung werden Knochenmarkausstriche und idealerweise parallel periphere Blutausstriche untersucht. In einer panoptischen Färbung des Knochenmarkausstriches können die Zelldichte und die hämatopoetischen Reihen (Erythro-, Granulo- und Megakaryopoese) beurteilt und im Verhältnis zueinander eingeschätzt werden. Die leukämischen Blasten können morphologisch identifiziert werden [4]. Diese besitzen runde bis unregelmäßig geformte Zellkerne mit distinkten Nukleoli und wenig Zytoplasma [3]. Nach den FAB-Diagnosekriterien (French-American-British Cooperative Group) ist die AML definiert

als eine Infiltration des Knochenmarks mit mindestens 30 % Blasten [56;57]. In der neueren WHO-Klassifikation (World Health Organization) wird bereits bei einer blastären Knochenmarkinfiltration von 20 % und mehr die Diagnose AML gestellt [58].

Zur weiteren Differenzierung der Blasten werden zytochemische Färbungen, vor allem auf Myeloperoxidase (MPO) und unspezifische Esterase, durchgeführt. Der Nachweis von MPO weist auf den myeloischen Ursprung der Zellen hin. Unspezifische Esterase wird bei Zellen der monozytären Reihe nachgewiesen, wie es bei einigen FAB-Subtypen (M4 und M5) der Fall ist. Durch Berliner-Blau-Färbung werden ggf. pathologische Eisenspeicherungen dargestellt, z. B. bei dysplastischer Erythropoese beim MDS. Eine sichere Unterscheidung der AML und der ALL (akute lymphatische Leukämie) gelingt durch Immunphänotypisierung [3;4]. Beim Nachweis von Auer-Stäbchen kann man die Blasten zweifelsfrei der myeloischen Reihe zuordnen, so dass in diesem Fall eine weitere Typisierung nicht zwingend erforderlich ist. Auer-Stäbchen lassen sich mit Pappenheim-Färbung als rotviolette, aus azurophilen Granula zusammengesetzte Zellorganellen nachweisen, in Enzymgehalt und Struktur gleichen sie Lysosomen. In Bündeln liegende Auer-Stäbchen sind pathognomonisch für die akute Promyelozytenleukämie. Außer in neoplastischen Zellen bei verschiedenen Unterformen der AML sind sie beim MDS und bei refraktärer Anämie mit Blastenexzess nachweisbar [4].

1.7 Klassifikationen nach FAB und WHO

Nach zytomorphologischen und zytochemischen Kriterien wird die AML durch die FAB-Klassifikation in verschiedene Subtypen unterteilt [56;57]. Die Einteilung korreliert mit einigen Charakteristika wie zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen. Die Diagnose AML wird nach FAB-Kriterien erst bei einem Blastenanteil im Knochenmark von mindestens 30 % gestellt. Einen Überblick über die verschiedenen FAB-Subtypen gibt Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1: Definition der Subtypen der AML nach FAB und Assoziation mit genetischen Veränderungen [4].

FAB-Subtyp	Beschreibung	FAB-Kriterien				Assoziation		
		Granulozytopoese	Monozytopoese	Erythropoese	Immunologische Marker	Zytogenetisch	Molekulargenetisch	Häufigkeit
M0	Akute myeloblastische Leukämie mit minimaler Differenzierung	< 10 %, MPO* < 3 %	< 20 %	< 50 %	Myeloisch positiv Lymphatisch negativ			
M1	Akute myeloblastische Leukämie ohne Ausreifung	< 10 %, MPO* > 3 %	< 20 %	< 50 %		t(8;21)	AML1/ETO	1,7 %
M2	Akute myeloblastische Leukämie mit Ausreifung	> 10%	< 20 %	< 50 %		t(8;21)	AML1/ETO	12,5 %
M3	Akute Promyelozytenleukämie	Hypergranulär, Auer-Stäbchen	< 20 %	< 50 %	HLA-DR negativ	t(15;17)	PML/RAR α	98 %
M3v	Akute Promyelozytenleukämie, mikrogranuläre Variante	Mikrogranulär, Monozytoide Kerne	< 20 %	< 50 %	HLA-DR negativ	t(15;17)	PML/RAR α	
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	> 20%	> 20%	< 50 %				
M4eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit abnormer Eosinophilie	> 20 %, abnorme Eosinophilie	> 20%	< 50 %		inv(16)/t(16;16)	CBF β /MYH11	100%
M5a	Akute monozytäre Leukämie, unreif	< 20 %	> 80%, unreif	< 50 %		11q23-Aberrationen	MLL-Aberration	31%
M5b	Akute monozytäre Leukämie, reif	< 20%	> 80%, reif	< 50 %		11q23-Aberrationen	MLL-Aberration	17%
M6	Erythroleukämie	> 30 % der nichterythrozytären Zellen sind Blasten	variabel	> 50 %				
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie	> 30% Megakaryoblasten	variabel	< 50 %	CD41/CD61 positiv			

*MPO: Myeloperoxidase.

Die neuere WHO-Klassifikation berücksichtigt auch molekulargenetische und klinische Aspekte. Eine AML liegt nach dieser Definition bereits bei 20 % Blasten im Knochenmark vor [58]. Die WHO klassifiziert die AML wie folgt (Tabelle 1.2):

Tabelle 1.2: WHO-Klassifikation der AML [58]

<p><i>AML mit rekurrenten genetischen Aberrationen</i></p> <p>AML mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)</p> <p>AML mit abnormen Knochenmark-Eosinophilen und inv(16)(p13;q22) oder t(16;16)(913;q22), (CBFβ/MYH11)</p> <p>Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)(q22;q12); (PML/RARα) und Varianten</p> <p>AML mit 11q23(MLL)-Aberrationen</p>
<p><i>AML mit Multiliniendysplasie</i></p> <p>AML mit vorausgegangenem MDS / myeloproliferativer Erkrankung</p> <p>AML ohne vorausgegangenem MDS / myeloproliferative Erkrankung, aber mit Dysplasie in mindestens 50 % der Zellen in 2 oder mehr myeloischen Linien</p>
<p><i>AML und MDS, therapieassoziiert</i></p> <p>Assoziation mit alkylierenden Substanzen / Strahlung</p> <p>Assoziation mit Topoisomerase II</p> <p>Andere therapieassoziierte Typen</p>
<p><i>AML, nicht anderweitig kategorisiert*</i></p> <p>AML, minimal differenziert</p> <p>AML ohne Reifung</p> <p>AML mit Reifung</p> <p>Akute myelomonozytäre Leukämie</p> <p>Akute monoblastische / akute monozytäre Anämie</p> <p>Akute erythroide Leukämie (erythroid / myeloid und reine Erythroleukämie)</p> <p>Akute megakaryoblastische Leukämie</p> <p>Akute basophile Leukämie</p> <p>Akute Panmyelose mit Myelofibrose</p> <p>Myeloides Sarkom</p>

*Die Unterkategorien in dieser Gruppe sind im Wesentlichen definiert wie die entsprechenden Kategorien der FAB-Klassifikation

1.8 Prognostische Faktoren

Die prognostische Bedeutung der einzelnen in den leukämischen Zellen gefundenen genetischen Veränderungen wurde in Kapitel 1.5 diskutiert. Ein komplex aberranter Karyotyp mit mindestens drei strukturellen und / oder numerischen Aberrationen ohne Beteiligung von t(15;17), inv(16) oder t(8;21) ist ein deutlich schlechter prognostischer Faktor hinsichtlich Therapieansprechen und Überleben. Ein hohes

Alter des Patienten und eine hohe Leukozytenzahl im peripheren Blut zu Therapiebeginn sind ungünstige prognostische Faktoren für den Erfolg der Chemotherapie, die Remissionsdauer und das Überleben. Bei älteren Patienten wird vermehrt eine Überexpression des Multi-drug-resistance-Gens MDR1 nachgewiesen. Solche Patienten zeigen häufig ein schlechtes Therapieansprechen und eine kürzere Überlebensdauer. Auch sekundäre AML-Formen sind mit einem schlechten Ansprechen auf die Induktionschemotherapie assoziiert. Der Blastengehalt des Knochenmarks 7 Tage nach Ende des ersten Zyklus der Induktionschemotherapie ist prognostisch wichtig für das Überleben. Günstig ist ein Nachweis von < 5 % Blasten, ungünstig ein Blastengehalt von 10 % und mehr [4].

1.9 Therapie der AML

Bei Erstdiagnose der AML gliedert sich die Therapie in eine Induktionstherapie zur schnellen Reduktion der Leukämiezellmasse und in eine Postremissionsbehandlung. Die Behandlung sollte nach Möglichkeit im Rahmen klinischer Studien erfolgen.

Ziel der Induktionstherapie ist die komplette Remission, die definiert ist als Abwesenheit von Krankheitssymptomen bei normalen Zellzahlen im peripheren Blut und einem Knochenmark mit einem Blastenanteil unter 5 % ohne leukämischen Phänotyp bei einer Zellularität von mindestens 20 %. Die Induktionstherapie wird häufig als sogenannte Doppelinduktion mit zwei Therapiezyklen durchgeführt. Hierdurch wird ein besserer Langzeittherapieerfolg erreicht im Vergleich mit Regimen, bei denen ein zweiter Zyklus nur bei Nichterreichen der kompletten Remission durch die erste Induktion gegeben wird. Die Zytotoxizität ist bei Doppelinduktion jedoch gravierender [59]. Der Therapieerfolg wird durch Knochenmarkpunktion kontrolliert, üblicherweise eine bis zwei Wochen nach Abschluss der Chemotherapie. Die Induktion wird gewöhnlich als Kombinationschemotherapie im Rahmen eines Studienprotokolls durchgeführt. Meist wird hierbei Cytarabin mit einem Anthrazyklin kombiniert, verwendet werden unter anderem protokollabhängig auch Thioguanin, Fludarabin, Etoposid und Topotecan [59-65]. In Studien werden auch andere Chemotherapeutika bei AML-Patienten eingesetzt, hierzu gehören auch Farnesyltransferase-Inhibitoren, die die posttranslationale Aktivierung von Ras-Proteinen blockieren (siehe auch Kapitel 1.5).

Nach erfolgreicher Induktionstherapie wird zur Sicherung der kompletten Remission eine Postremissionstherapie durchgeführt. Diese kann in Form von Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie, allogener oder autologer Stammzelltransplantation erfolgen. Die Entscheidung für Chemotherapie oder Stammzelltransplantation wird je nach Verfügbarkeit eines passenden Spenders und dem Risikoprofil des einzelnen Patienten getroffen; hier spielen zytogenetische und molekularbiologische Charakteristika der Krankheit, Remissionsstadium, Alter und Begleiterkrankungen eine Rolle [59;66].

Bei günstigem Risikoprofil wird bei Patienten in erster Remission in der Regel eine Konsolidierungstherapie durchgeführt [59;66]. Hierzu werden wie bei der Induktionstherapie unterschiedliche Therapieprotokolle verwendet. Auch hier werden vielfach Cytarabin-basierte Behandlungsregime eingesetzt. Eine angeschlossene zyklische Erhaltungstherapie wirkt sich positiv auf das rezidivfreie Überleben aus [59].

Stammzelltransplantationsregime basieren auf der Strategie, durch hochdosierte Radio- / Chemotherapie die leukämischen Zellen komplett zu vernichten. Die hierzu verabreichte Konditionierungstherapie schädigt das gesunde Knochenmark ebenfalls sehr stark oder zerstört es vollständig, so dass dem Patienten eigene, vor der Konditionierung konservierte (autologe Stammzelltransplantation), oder fremde, HLA-identische (allogene Stammzelltransplantation) Knochenmarkstammzellen transplantiert werden müssen, um eine normale Hämatopoese wiederherzustellen [59]. Die übertragenen blutbildenden Zellen tragen darüber hinaus ebenfalls zur antileukämischen Wirkung bei (Graft-versus-Leukämia-Effekt) [66]. Die allogene Stammzelltransplantation scheint im Vergleich mit anderen Therapieregimen die Rezidivrate signifikant zu verringern, ist aber mit höheren therapieassoziierten Komplikationen verbunden [66].

2 Herleitung der Fragestellung

Die akute myeloische Leukämie ist eine neoplastische Erkrankung der blutbildenden Zellen des Knochenmarks. Durch Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen in den hämatopoetischen Stammzellen kommt es zur malignen Entartung.

Die Gene der Ras-Familie, die in die Regulation von Proliferation und Differenzierung von Zellen involviert sind, sind bei Leukämien und vielen anderen Tumorerkrankungen häufig von Mutationen betroffen. Bei der AML sind N-ras und K-ras am häufigsten verändert. Die klinische Bedeutung der Ras-Mutationen bei der AML konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Es ist unklar, ob von Relevanz ist, welches der Ras-Gene mutiert ist. Viele bisher publizierte Untersuchungen unterscheiden nicht zwischen den Alterationen in den verschiedenen Ras-Genen oder untersuchen ausschließlich N-ras-Mutationen, so dass insbesondere für K-ras-Mutationen unzureichende Daten vorhanden sind [27;29;35]. Veränderungen in den Ras-Genen treten ganz überwiegend als Punktmutationen in Kodon 12, 13 oder 61 auf. Zur Mutationsanalyse wurden in bisherigen Publikationen verschiedene Methoden eingesetzt, unter anderem allelspezifische PCR-Amplifikation (ASA), allelspezifische Oligonukleotid-Hybridisierung (ASH), Single strand conformation polymorphism (SSCP) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) [28;29;32;34;40;67-69]. Mit diesen Techniken konnten Sensitivitäten bis 1×10^{-4} erreicht werden [70]. Solche Sensitivitäten reichen für den Nachweis sehr geringer Anteile mutierter Allele vor einem Hintergrund an Wildtyp-DNA gegebenenfalls nicht aus, eine Situation, die beispielsweise bei minimaler Resterkrankung nach Chemotherapie oder im frühen Stadium eines Krankheitsrezidiv auftreten kann.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer hochempfindlichen Methode zum Nachweis von Mutationen im häufig von Alterationen betroffenen Kodon 12 des K-ras-Protoonkogens im Blut von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie. Die Methode sollte schnell und einfach zu handhaben sein und reproduzierbar einen spezifischen Nachweis der Mutationen ermöglichen. Dabei sollte die quantitative PCR im LightCycler® unter Verwendung sequenzspezifischer Hybridisierungssonden als sensibles und schnelles Verfahren zum Einsatz kommen. Zur Erhöhung der Sensitivität und Sicherstellung der Mutationsspezifität wurden PNA-Bausteine

verwendet, die durch Verhinderung der Sondenbindung an Wildtypallele eine selektive Messung der mutierten Allele ermöglichen.

Nach Optimierung der Nachweismethode wurde an einem Kollektiv von AML-Patienten eine Verlaufsbestimmung von Mutationen im Kodon 12 des K-ras-Gens durchgeführt. Hierbei wurde zunächst untersucht, wie häufig solche Mutationen bei AML-Patienten mit Hilfe des eingesetzten Verfahrens nachgewiesen werden können. Eine Assoziation von K-ras-Mutation zu bestimmten Charakteristika der Patienten (Alter, Geschlecht) oder der Erkrankung (FAB-Subtyp, zytogenetische Befunde, Blastenanteil im Blut und im Knochenmark) wurde statistisch überprüft. Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob der K-ras-Mutationsstatus einen prognostischen Faktor hinsichtlich des Krankheitsverlaufes (Therapieansprechen, Rezidivrate, Überleben) darstellt. Durch die regelmäßige Kontrolle des K-ras-Mutationsstatus vor, während und nach der Chemotherapie wurde überprüft, inwieweit die Ergebnisse der Mutationsanalyse sich unter der Therapie und bei einem möglichen Krankheitsrezidiv verändern, insbesondere wurde evaluiert, ob sich die Kontrolle des K-ras-Status im peripheren Blut als Parameter des Krankheitsverlaufes eignet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Agar-Agar	BD Diagnostic Systems, Sparks, USA
Agarose	Sigma, München, D
Ampicillin	Boehringer, Mannheim, D
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen, D
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, D
BSA (bovines Serum-Albumin)	New England Biolabs, Ipswich, USA
DNA-Größenstandard 123 bp	Life Technologies, Gaithersburg, USA
DNA-Größenstandard 25 bp	Life Technologies, Gaithersburg, USA
DNA-Größenstandard MGM IV	Boehringer, Mannheim, D
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol, reinst	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma, Sternheim, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Sternheim, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Glycerol	Merck, Darmstadt, D
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, D
Humane Plazenta-DNA	Sigma, Sternheim, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt, D
MgCl_2	Invitrogen, Carlsbad, USA
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
NH_4Cl	Merck, Darmstadt, D
Protein Amplyfly	Gene Express, Berlin, D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Trizma® Base, Tris)	Sigma, Sternheim, D
Trypton	Roth, Karlsruhe, D
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-Indoyl- β -D-galaktopyranosid)	Roth, Karlsruhe, D

3.1.2 Enzyme

AmpliTaq DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Foster City, USA
Platinum Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt, D
Restriktionsendonuklease BstNI	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsendonuklease EcoRI	New England Biolabs, Ipswich, USA
RNAse A	Sigma, Sternheim, D

3.1.3 Puffer und Lösungen

10 x PCR-Puffer (ohne Mg ²⁺)	Gibco BRL, Eggenstein, D
EcoRI-Puffer	New England Biolabs, Ipswich, USA
NEB2-Puffer (NEBuffer 2)	New England Biolabs, Ipswich, USA
1 x Erythrozytenlysepuffer	8,29 g NH ₄ Cl (1,5 M) ad 1000 ml Aqua dest.
1 x TAE (Trisacetat/EDTA)-Puffer	2,42 g Tris 0,57 ml Essigsäure 1,00 ml EDTA (pH=0,8; 0,5 M) ad 500 ml Aqua dest.
DNA-Gelladepuffer	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerol in Aqua dest.
1 x PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung), pH 7,4	8,00 g NaCl 0,20 g KCl 0,24 g KH ₂ PO ₄ 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ad 1000 ml Aqua dest.

3.1.4 Medien

SOC-Medium	2,0 % Trypton	Invitrogen, Carlsbad, USA
	0,5 % Hefeextrakt	
	10,0 mM NaCl	
	2,5 mM KCl	
	10,0 mM MgCl ₂	
	10,0 mM MgSO ₄	
	20,0 mM Glucose	

LB (Lysogeny broth)-Medium, pH 7,0	1,0 % Trypton	
	0,5 % Hefeextrakt	
	1,0 % NaCl	
	in Aqua dest.; autoklaviert	

3.1.5 Zelllinien

Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie MiaPaCa2	Herr Schuhmacher, Charité, Berlin, D
Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie Panc1	Herr Kalthoff, Universität Kiel, D
Humane Kolonkarzinom-Zelllinie SW480	Herr Raudies, Charité, Berlin, D

3.1.6 Kits zur DNA-Präparation

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, D

3.1.7 Kit zur Klonierung

Topo TA Cloning Kit mit Vektor pCR2.1- TOPO und One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
--	---------------------------

3.1.8 Oligonukleotide

Sämtliche verwendete Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, D, hergestellt. Die Sequenzen sind in der Orientierung 5' → 3' angegeben:

Primer K-ras 5'-1st:

ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT

Primer DD5P:

TCA TGA AAA TGG TCA GAG AA

Primer K-ras 5'-2nd:

ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA ACC T

Primer K-ras 3':

TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC

Primer K-ras F:

AAG GCC TGC TGA AAA TGA CTG

Primer K-ras R:

GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGC A

Donorsonde FL:

CGT CCA CAA AAT GAT TCT GAA TTA GCT GTA TCG TCA AGG CAC T - F

Akzeptorsonde LC 12-Val Sensor.

LC-Red640 - TTG CCT ACG CCA ACA GCT CCA A - P

Akzeptorsonde LC 12-Cys Sensor.

LC-Red705 - TTG CCT ACG CCA CAA GCT CCA A - P

Akzeptorsonde LC 12-Asp Sensor:

LC-Red640 - TTG CCT ACG CCA TCA GCT CCA A - P

PNA-17

CCT ACG CCA CCA GCT CC

3.1.9 Geräte

Elektrophoresekammer Horizon 11-14	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Feinwaage PE 1600/9	Mettler-Toledo, Giessen, D
Inkubationsschrank für Bakterien	Bachofer, Reutlingen, D
Inkubationsschüttler Certomat H	B. Braun, Melsungen, D
LightCycler®-Kapillaren	Roche, Mannheim, D
LightCycler®-Karussellzentrifuge	Roche, Mannheim, D
LightCycler®-II-Gerät	Roche, Mannheim, D
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, D
Mikrowellenherd Micro-Chef FM 2910 Q	Moulinex, Ecully Cedex, F
Mikrozentrifuge SD 220 Vac	Roth, Karlsruhe, D
Minifuge RF	Heraeus, Hanau, D
Neubauer-Zählkammer	Karow, Berlin, D
Pipetman®-Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Reagenzglasschüttler Reax Control	Heidolph, Schwabach, D
Spannungsgerät Model 200 / 2.0	Bio-Rad, Richmond, USA
Spektralphotometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK
Thermoblock Digi-Block	Laboratory Devices, Holliston, USA
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D

TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
UV-Transilluminator	Herolab, Wiesloch, D
Vortex-Schüttler Vibrofix VF1	IKA-Labortechnik, Staufen i. Br., D
Wasserbad mit Umwälzthermostat E52	Haake, Berlin / Karlsruhe, D

3.1.10 Verbrauchsmaterialien

EDTA-haltige Blutabnahmeröhrchen (Monovette) 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, DK
Mikrotiterplatten HLA-S	Nunc, Roskilde, DK
Pasteur-Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Parafilm	American National Can, Neenah, USA
PCR-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen epT.I.P.S. 0,5-20 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen 20-500 µl	Corning, New York, USA
Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße 15 ml	Falcon, Lincoln Park, USA
Sofortbildfilm Polaplan 667	Polaroid, Waltham, USA
Sterilindikatorband Sekuroka	Roth, Karlsruhe, D
Zentrifugenröhrchen 12ml	Sarstedt, Nümbrecht, D

3.2 Methoden

3.2.1 Leukozytenanreicherung aus Vollblut

Es wurde 9 ml periphervenöses Blut in EDTA-haltige Röhrchen abgenommen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zur Sedimentation der korpuskulären Bestandteile wurde das Blut 60 Minuten in den aufrecht stehenden Abnahmeröhrchen belassen. Der Plasma-Überstand und der Leukozytenring wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für zehn Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert, um die Leukozyten zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde in 9 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für zehn Minuten inkubiert, um noch vorhandene Erythrozyten zu lysieren. Das Röhrchen wurde danach erneut bei 1.500 rpm zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Leukozyten wurden in 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und die Lösung zu gleichen Teilen auf zwei Reaktionsgefäße (1,5 ml) verteilt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 1.500 rpm wurde der Überstand vollständig abgenommen und verworfen. Die Leukozytenpellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.2 Isolierung genomischer DNA

Die DNA aus den Leukozytenpellets wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits isoliert. Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll für Blut und Körperflüssigkeiten (Blood and Body Fluid Spin Protocol) des Kits. Die in 20 μl sterilem Wasser resuspendierte DNA wird bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Bei der Präparation von DNA aus Zellen der Zelllinien SW480, MiaPaCa2 und Panc1 wurde nach dem gleichen Protokoll vorgegangen.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese der präparierten DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarosegelen (0,5 - 4 % w/v Agarose in 1 x TAE-Puffer) mit 0.005 % Ethidiumbromid bei 100-130 V [71]. Das Ergebnis wurde anschließend auf dem UV-Transilluminator bewertet und dokumentiert.

3.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Für die Messung wurde die DNA gegebenenfalls mit Wasser verdünnt. Als Referenz diente das Lösungsmittel. Eventuelle Verunreinigungen der Nukleinsäuren mit Proteinen wurden durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm überprüft. Der Quotient OD 260 nm / OD 280 nm sollte zwischen 1,7 und 2,1 liegen.

3.2.5 Quantitative PCR im LightCycler®

3.2.5.1 Prinzip der LightCycler®-Technologie

Die isolierte DNA wurde mittels quantitativer PCR im LightCycler®-Gerät untersucht. Dieses verfügt neben der Cyclyer-Komponente über ein integriertes Fluoreszenzphotometer, wodurch umfangreiche Untersuchungen wie Quantifizierung und Mutationsanalyse in Echtzeit möglich sind. Durch speziell gestaltete Probengefäße (LightCycler®-Kapillaren) mit sehr hohem Oberflächen/Volumen-Verhältnis und die Möglichkeit rascher Temperaturänderungen ist der LightCycler® für besonders schnelle Reaktionsabläufe optimiert, so dass der Zeitbedarf für eine PCR unter einer Stunde liegt. Die Daten der Fluoreszenz-Messung wurden durch einen an das Gerät angeschlossenen Computer mit Hilfe der LightCycler®-Software ausgewertet. Weitere Arbeitsschritte zur Analyse der PCR-Produkte wie Gel-Elektrophorese oder Southern blotting wurden somit unnötig. Durch die direkte Analyse war zudem das Risiko von Probenkontaminationen minimiert.

3.2.5.2 Quantitative PCR-Analyse mit Hilfe von Hybridisierungssonden

Die Verwendung von Hybridisierungssonden ermöglichte eine hochspezifische Detektion der amplifizierten DNA-Sequenzen während des Ablaufes der PCR. Als Sonden wurden zwei Oligonukleotide benutzt, die innerhalb des zu amplifizierenden Fragments mit benachbarten Zielsequenzen des DNA-Einzelstranges hybridisieren. Das an seinem 3'-Ende mit Fluoreszin markierte 5'-Oligonukleotid wird als Donorsonde (oder Anker) bezeichnet. Die an ihrem 5'-Ende an das Fluorophor LightCycler®-Red-640 oder -705 gekoppelte Akzeptorsonde (3'-Oligonukleotid, Sensor) bindet direkt daneben. Während der Hybridisierungsphase gelangen Donor- und Akzeptor-Farbstoff in direkte räumliche Nähe. Nach Anregung des Fluoreszins

durch Licht einer Wellenlänge von 470 nm wird Energie auf den Akzeptor übertragen (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer, FRET). Der so angeregte Akzeptor emittiert Licht einer anderen Wellenlänge (640 bzw. 705 nm). Dieses Licht wird durch dichrotische Spiegel, abhängig von der Wellenlänge, in einen von drei Detektionskanälen gelenkt und dort erfasst. Die gemessene Lichtintensität ist dabei zur Anzahl der an die DNA gebundenen Hybridisierungssondenpaare und damit zur Menge der Amplifikationsprodukte proportional. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in jedem PCR-Zyklus am Ende der Annealing-Phase. Bei Mitführung einer Standardreihe mit bekannten Anfangsmengen der untersuchten Sequenz war mit Hilfe der LightCycler®-Software aus den gewonnenen Fluoreszenzdaten eine Quantifizierung der Proben-DNA möglich.

3.2.5.3 Selektive Detektion der mutierten Allele

Zum Nachweis relevanter Punktmutationen innerhalb des Kodons 12 des K-ras-Gens wurden spezifische Akzeptorsonden für die Valin-, Cystein- und Aspartatmutation designt. Die Hybridisierung des Donors erfolgte in 5'-Richtung unmittelbar neben der Sequenz der Akzeptorbindung.

In den klinischen Proben stellen die mutierten Allele nur einen sehr geringen Anteil aller K-ras-Kopien dar; sie werden vom Wildtyp zahlenmäßig weit übertroffen. Da eine Sondenbindung jedoch nicht ausschließlich an vollständig komplementäre Sequenzen erfolgt, wurden spezifische PNAs (Peptide nucleic acids) eingesetzt, die die Bindung der Hybridisierungssonden an die Wildtypsequenz supprimieren. Bei PNAs handelt es sich um Oligonukleotide, bei denen das Desoxyribosephosphat-Rückgrat durch 2-Aminoethyl-Glycin-Einheiten ersetzt ist. Bei vollständiger Basenpaarung binden PNA-Bausteine thermodynamisch stabiler an komplementäre DNA-Sequenzen als entsprechende DNA-Oligonukleotide. Die Bindung unvollständig komplementärer Sequenzen ist stärker destabilisiert [72;73]. Bei vollständiger Unterdrückung der Sondenbindung an die Wildtypsequenz durch spezifische PNA-Bausteine entspricht das Fluoreszenzsignal selektiv den mutierten Allelen. Eine Amplifikation der Wildtypallele wird durch die PNAs nicht verhindert, da die Primersequenzen außerhalb der PNA-Bindungsstelle liegen.

Eine qualitative Bestimmung der Punktmutationen erfolgte durch eine an die PCR angeschlossene Schmelzpunktanalyse. Hierzu wurde bei langsamer, gleichmäßiger Erhöhung der Temperatur (von 40 °C auf 85 °C, Transitionsrate 0,3 °C/s) das

Fluoreszenzsignal der Proben kontinuierlich gemessen. Die Hybridisierungssonden dissoziieren bei einer bestimmten Temperatur von ihrer Bindungssequenz, wodurch die FRET-Partner voneinander getrennt werden und es zu einem schnellen Abfall der Fluoreszenz kommt. Durch Analyse der Schmelzkurve mit der LightCycler®-Software wurde die charakteristische Schmelztemperatur der Ziel-DNA bestimmt. Da je nach Grad der Basenübereinstimmung zwischen Sensor- und DNA-Sequenz die Bindungsenergie und damit die Schmelztemperatur variiert, war hierdurch eine Identifikation von Mutationen möglich.

3.2.5.4 Quantitativ-PCR-Protokolle

Die hier genannten PCR-Bedingungen sind das Resultat der Optimierungsexperimente, die in Kapitel 4 dargestellt sind.

Kontrolle der Amplifizierbarkeit der DNA und Quantifizierung des Gesamt-K-ras:

Die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA wurde anhand von 3 µl DNA-Lösung mit entsprechendem K-ras-Primerpaar im LightCycler® überprüft. Eine PCR ohne PNA misst mittels Hybridisierungssonden die Amplifikation des K-ras-Genes unabhängig von Mutationen. Zusätzlich zu den Proben wurden bei jeder PCR Negativkontrollen mitgeführt, die keine DNA enthielten. Des Weiteren dienten fünf verschiedene Standardproben mit unterschiedlichen Mengen DNA aus SW480-Zellen der Erstellung einer Standardkurve zur Quantifizierung der Gesamtzahl der K-ras-Kopien in den Proben. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist Tabelle 3.1 zu entnehmen. Die Reaktionsansätze wurden in die LightCycler®-Kapillaren pipettiert. Die verschlossenen Gefäße wurden in das Kapillarkarussell eingeordnet und nach kurzer Zentrifugation in der LightCycler®-Karussellzentrifuge in den Cycler eingesetzt. Der Reaktionsablauf ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit der DNA und zur Quantifizierung des Gesamt-K-ras.

<i>Volumen</i>	<i>Reagenz</i>
2,00 µl	10 x PCR-Puffer
1,50 µl	MgCl ₂ (50 mM)
1,00 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
2,00 µl	Primer K-ras F (10 µM)
2,00 µl	Primer K-ras R (10 µM)
1,00 µl	Ankersonde FL (6 mM)
1,50 µl	Sensorsonde Val-LC (6mM)
0,30 µl	Protein Amplyfly
0,45 µl	Platinum Taq DNA-Polymerase
0,00 – 3,00 µl	DNA-Lösung (probenabhängig)
5,25 – 8,25 µl	steriles Wasser zum Auffüllen auf das Endvolumen
20,00 µl	Endvolumen

Tabelle 3.2: Ablauf der PCR zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit der DNA und zur Quantifizierung des Gesamt-K-ras.

	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Transitionsrate</i>
<i>Initiale Denaturierung</i>	95 °C	3 min	20 °C / s
<i>Amplifikation (45 Zyklen)</i>	Denaturierung	95 °C	10 s
	Primer- / Sondenanlagerung	60 °C	15 s *
	Elongation	72 °C	20 s

*Fluoreszenzmessung am Ende des Reaktionsschrittes

Mutationsanalyse mit Quantifizierung der K-ras-Mutationen:

Die Untersuchung der klinischen Proben auf K-ras-Mutationen im Kodon 12 erfolgte im LightCycler® auf Grundlage der oben erläuterten Prinzipien. Während der PCR und bei der anschließenden Schmelzpunktanalyse erfolgte eine softwaregestützte Echtzeitanalyse mit Hilfe der Hybridisierungssonden. Bei jedem Versuch wurde eine Negativkontrolle ohne DNA und PNA mitgeführt, des weiteren eine Wildtypkontrolle mit 1 µg humaner Plazenta-DNA ohne PNA, sowie eine Standardreihe mit 1 ng, 500 pg, 100 pg, 50 pg und 20 pg DNA aus SW480-Zellen (Mutation im K-ras-Kodon 12: GGT [Glycin] → GTT [Valin]) bzw. entsprechender Standardwerte für die Cystein- bzw. Aspartat-Mutation, jeweils mit 1 µg Wildtyp-DNA und PNA. Die

Reaktionsgefäße für die klinischen Proben enthielten 7 µl Proben-DNA und PNA. Es wurde für jede Probe eine Doppelwert-Messung mit dem Valin-Sensor in Gegenwart von PNA durchgeführt. Bei zweifachem PCR- und Schmelzkurvenverlauf einer Probe analog der Negativkontrolle wurde diese Probe als K-ras-Wildtyp gewertet. Wurde hingegen eine Amplifikation des K-ras-Genes angezeigt, wurde bei einem der Valin-Mutation entsprechendem Schmelzpunkt angenommen, dass es sich bei der Probe um eine Valin-Mutation handelt. Bei einer anderen Schmelzpunkttemperatur war mit Hilfe der Cystein- und Aspartat-Sonden und Verwendung der entsprechenden Standardreihe eine weitere Typisierung möglich. Die Quantifizierung der Mutation wurde mit Hilfe der LightCycler®-Software und der eingesetzten Standardwerte durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt die in Tabelle 3.3 aufgeführten Reagenzien in den angegebenen Mengen.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes zur K-ras-Mutationsanalyse.

<i>Volumen</i>	<i>Reagenz</i>
2,00 µl	10 x PCR-Puffer
1,50 µl	MgCl ₂ (50 mM)
1,00 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
2,00 µl	Primer K-ras F (10 µM)
2,00 µl	Primer K-ras R (10 µM)
1,00 µl	Ankersonde FL (6 mM)
1,50 µl	Sensorsonde Val-/Cys-/Asp-LC (6mM)
0,30 µl	Protein Amplyfly
0,45 µl	Platinum Taq DNA-Polymerase
0,00 – 7,00 µl	DNA-Lösung (probenabhängig)
0,00 – 1,00 µl	PNA-Lösung (50 µM, probenabhängig)
0,25 – 8,25 µl	steriles Wasser zum Auffüllen auf das Endvolumen
<i>20,00 µl</i>	<i>Endvolumen</i>

Die Reaktionsansätze wurden in die LightCycler®-Kapillaren pipettiert. Die verschlossenen Gefäße wurden in das Kapillarkarussell eingeordnet und dieses nach kurzer Zentrifugation in der LightCycler®-Karussellzentrifuge in den Cyler eingesetzt. Die PCR und die anschließende Schmelzpunktanalyse erfolgten nach den in Tabelle 3.4 angegebenen Parametern.

Tabelle 3.4: Ablauf der PCR und der anschließenden Schmelzpunktanalyse zur K-ras-Mutationsanalyse

	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Transitionsrate</i>
<i>Initiale Denaturierung</i>	95 °C	3 min	20 °C / s
<i>Amplifikation (45 Zyklen)</i>	Denaturierung	95 °C	10 s
	PNA-Anlagerung	76 °C	7 s
	Primer- / Sondenanlagerung	60 °C	15 s *
	Elongation	72 °C	20 s
<i>Schmelzpunktanalyse</i>	95 °C	20 s	20 °C / s
	40 °C	20 s	20 °C / s
	85 °C	0 s **	0,3 °C / s

*Fluoreszenzmessung am Ende des Reaktionsschrittes; **kontinuierliche Fluoreszenzmessung

3.2.6 Enriched BstNI RFLP / PCR

Zum Vergleich der quantitativen PCR zur Detektion von K-ras-Mutationen mit einer etablierten, qualitativen Methode wurde die Enriched PCR mit Restriktionsenzymverdau (RFLP, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) in der von Mora et al. vorbeschriebenen Weise durchgeführt [74]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem selektiven Verdau der Wildtyp-Amplifikate mit dem Enzym BstNI zwischen zwei aufeinander folgenden PCRs. Durch Verwendung der Primer K-ras 5'-1st und DD5P in der ersten (Enriched) PCR enthalten die Amplifikate von Wildtyp-Allelen die Erkennungssequenz für BstNI (CCTGG). Bei K-ras-Mutationen im Kodon 12 tritt diese Erkennungssequenz nicht auf. Jeder Reaktionsansatz enthielt die in Tabelle 3.5 aufgeführte Menge der angegebenen Reagenzien. Es wurden 5 µl Proben-DNA pro Ansatz verwendet, für die Negativkontrolle wurde die DNA-Lösung durch steriles Wasser ersetzt. Die Ansätze wurden gemischt, in ein PCR-Probengefäß pipettiert und mit 50.0 µl PCR-Öl überschichtet. Die Reaktion fand im TRIO-Thermoblock (Biometra) mit den in Tabelle 3.6 genannten Parametern statt.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes der ersten (Enriched) PCR.

<i>Volumen</i>	<i>Reagenz</i>
5,00 µl	10 x PCR-Puffer
1,50 µl	MgCl ₂ (50 mM)
2,00 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,00 µl	Primer K-ras 5'-1 st (10 µM)
1,00 µl	Primer DD5P (10 µM)
0,25 µl	Platinum Taq DNA-Polymerase
0,00 – 5,00 µl	DNA-Lösung (probenabhängig)
34,25 – 39,25 µl	steriles Wasser zum Auffüllen auf das Endvolumen
50,00 µl	Endvolumen

Tabelle 3.6: Ablauf der ersten (Enriched) PCR.

	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
<i>Initiale Denaturierung</i>	95 °C	5 min
<i>Amplifikation (10 Zyklen)</i>	Denaturierung 92 °C	15 s
	Primeranlagerung 44 °C	15 s
	Elongation 72 °C	15 s

Für die Durchführung eines restriktionsenzymatischen Verdaus wurden 5,0 µl des PCR-Produktes mit 38,5 µl sterilem Wasser, 5,0 µl NEB-2-Puffer, 0,5 µl 100 x BSA und 1,0 µl BstNI (10.000 U / ml) gemischt, in einem PCR-Reaktionsgefäß mit 50,0 µl PCR-Öl überschichtet und bei 60°C eine Stunde inkubiert (TRIO-Thermoblock, Biometra).

Anschließend folgte eine zweite PCR zur weiteren Amplifikation. Die Zusammensetzung der Ansätze zeigt Tabelle 3.7. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurde der Ansatz mit 50,0 µl PCR-Öl überschichtet. Die Reaktion im TRIO-Thermoblock (Biometra) fand unter den Bedingungen statt, die in Tabelle 3.8 aufgeführt sind.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes der zweiten (Enriched) PCR.

<i>Volumen</i>	<i>Reagenz</i>
5,00 µl	10 x PCR-Puffer
1,50 µl	MgCl ₂ (50 mM)
2,00 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,00 µl	Primer K-ras 5'-2 nd (10 µM)
1,00 µl	Primer K-ras 3' (10 µM)
0,25 µl	Platinum Taq DNA-Polymerase
1,00 µl	Produkt des Restriktionsverdaus
38,25 µl	steriles Wasser zum Auffüllen auf das Endvolumen
<i>50,00 µl</i>	<i>Endvolumen</i>

Tabelle 3.8: Ablauf der zweiten (Enriched) PCR.

	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
<i>Initiale Denaturierung</i>	95 °C	5 min
<i>Amplifikation (35 Zyklen)</i>	Denaturierung 92 °C	15 s
	Primeranlagerung 54 °C	15 s
	Elongation 72 °C	15 s

Anschließend wurde eine Elektrophorese in einem vierprozentigen Agarosegel durchgeführt. Es wurden jeweils 30 µl des Enriched-PCR-Produktes auf einer Mikrotiterplatte mit 3 µl Gelladepuffer gemischt und in eine Geltasche pipettiert. Als DNA-Größenstandard wurde die 25-bp-Leiter gewählt. Nach 90-minütiger Elektrophorese bei 100 V wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator ausgewertet. Die 143-bp-Bande entsprach hierbei dem mutierten Allel, die 114-bp-Bande dem Wildtyp. Die in der 2. PCR-Runde verwendeten Primer K-ras-5'-2nd und K-ras-3' erlaubten die Überprüfung der Vollständigkeit des enzymatischen Verdaus im Gel anhand einer zusätzlichen 128-bp-Bande.

3.2.7 Klonierung

Punktmutationen im Kodon 12 des K-ras-Genes finden sich in den für diese Arbeit verwendeten humanen Zelllinien SW480 (Kolon-Karzinom, GGT [Glycin] → GTT [Valin]), MiaPaCa2 (Pankreas-Karzinom, GGT [Glycin] → TGT [Cystein]) und Panc1

(Pankreas-Karzinom, GGT [Glycin] → GAT [Aspartat]). MiaPaCa2- und Panc1-Zellen sind jedoch nicht strikt euploid. Die Erstellung einer Standardreihe war Voraussetzung für die Quantifizierung der Mutationen in den klinischen Proben. Daher wurden die K-ras-Sequenzen der Cystein- und Aspartat-Mutationen kloniert. Hierfür wurde das TOPO TA Cloning Kit verwendet, das die direkte Insertion der amplifizierten K-ras-Gene in einen Plasmidvektor ermöglicht. Nach Transformation der ligierten Plasmid-DNA in kompetente Bakterien (*Escherichia coli*) und entsprechender Selektion erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien. Zur Verifizierung der K-ras-Gensequenz wurden die Plasmide sequenziert. Die Quantifizierung der DNA ermöglichte die Erstellung einer Standardreihe. Die einzelnen Arbeitsschritte und die zugrundeliegenden Prinzipien werden im Folgenden erläutert.

3.2.7.1 Amplifikation des K-ras-Gens

Das mutierte K-ras-Gen der Zelllinien MiaPaCa2 und Panc1 wurde mit Hilfe der PCR aus der genomischen DNA dieser Zellen amplifiziert. Jeder Reaktionsansatz setzte sich entsprechend Tabelle 3.9 zusammen.

Die Ansätze wurden in einem Probengefäß gemischt, kurz zentrifugiert und mit 50 µl PCR-Öl überschichtet. Die PCR wurde im TRIO-Thermoblock durchgeführt (siehe Tabelle 3.10).

Tabelle 3.9: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes zur Amplifikation des mutierten K-ras-Gens der Zelllinien MiaPaCa2 und Panc1.

<i>Volumen</i>	<i>Reagenz</i>
5,00 µl	10 x PCR-Puffer
4,00 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,25 µl	Primer K-ras F (10 µM)
1,25 µl	Primer K-ras R (10 µM)
0,25 µl	AmpliTaq DNA-Polymerase
1,00 µl	DNA aus MiaPaCa2- bzw. Panc1-Zellen
37,25 µl	steriles Wasser zum Auffüllen auf das Endvolumen
50,00 µl	Endvolumen

Tabelle 3.10: Ablauf der PCR zur Amplifikation des mutierten K-ras-Gens der Zelllinien MiaPaCa2 und Panc1.

	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
<i>Initiale Denaturierung</i>	95 °C	3 min
<i>Amplifikation (35 Zyklen)</i>	Denaturierung 92 °C	1 min
	Primeranlagerung 60 °C	1 min
	Elongation 72 °C	1 min

3.2.7.2 Ligation des PCR-Produktes mit dem Klonierungsvektor

Der in dem verwendeten Kit enthaltene linearisierte Plasmidvektor pCR2.1-TOPO ist mit einzelnen 3'-Thymidin-Überhängen sowie kovalent gebundener Topoisomerase I ausgestattet (sogenannter „aktivierter Vektor“). Durch die matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität der Taq-Polymerase wurden die PCR-Produkte an ihrem 3'-Ende um ein Adenosin verlängert, wodurch die Insertion in den Vektor ermöglicht wurde.

Nach diesem Prinzip wurden die PCR-Produkte durch zehnminütige Inkubation bei 72 °C (TRIO-Thermoblock, Biometra) mit 0,5 µl AmpliTaq DNA-Polymerase für die Ligationsreaktion vorbereitet. Im Anschluss wurde 1 µl dieses Produktes mit 1 µl der im Kit enthaltenen Salzlösung, 3 µl sterilem Wasser und 1 µl des Vektors pCR2.1-TOPO vorsichtig gemischt und der so entstehende Ligationsansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bis zur anschließenden Transformation wurde das Ligationsprodukt auf Eis gelagert.

3.2.7.3 Transformation von *Escherichia coli*

Zur Transformation der Plasmide in *Escherichia coli* (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*) wurde zunächst ein Aliquot von 50 µl dieser Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl des Ligationsansatzes und vorsichtiger Mischung erfolgten eine zehnminütige Inkubation auf Eis und ein anschließender Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 30 Sekunden. Anschließend wurden die Bakterien in 250 µl SOC-Medium suspendiert und unter andauernder Rotation des Reaktionsgefäßes eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.2.7.4 Ausplattieren und Selektion der Bakterien

Da der verwendete Klonierungsvektor für eine Ampicillin-Resistenz kodiert, wurden die transformierten Bakterien zur Selektion auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen.

Zusätzlich ist bei pCR2.1-TOPO eine sogenannte Blau-Weiß-Selektion möglich: Die Insertion eines DNA-Fragmentes in den Vektor führt zur Inaktivierung des lacZ-Gens, welches für das α -Fragment der β -Galaktosidase kodiert. Für die Aktivierung der β -Galaktosidase muss das ω -Fragment durch das α -Fragment komplettiert werden. X-Gal wird durch die β -Galaktosidase zu einem Inolyl-Derivat hydrolysiert, wodurch es zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonien kommt. Transformierte Bakterien, in denen das lacZ-Gen durch Insertion eines DNA-Fragmentes unterbrochen ist, wachsen auf X-Gal-haltigen Agarplatten als weiße Kolonien, wohingegen Klone ohne Insertion das α -Fragment exprimieren und eine blaue Färbung zeigen.

LB-Agar-Platten mit Ampicillin (50 μg / ml) wurden mit 30 μl X-Gal bestrichen und auf 37 °C erwärmt. Auf zwei Agar-Platten wurden 30 μl bzw. 80 μl der Bakterienlösung ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Insgesamt wurden 10 weiße Einzelkolonien ausgewählt. Jeweils 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 μg / ml) wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 250 rpm und 37 °C inkubiert.

3.2.7.5 Isolation der Plasmid-DNA

Die Plasmid-Präparation erfolgte mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits nach dem „Spin Miniprep Kit“-Protokoll.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte Plasmid-DNA bei 4 °C gelagert.

3.2.7.6 Untersuchung der Plasmid-DNA im Spektralphotometer

Analog der unter 3.2.4 beschriebenen Verfahrensweise wurde die Plasmid-DNA extinktionsphotometrisch quantifiziert und auf Verunreinigungen überprüft.

3.2.7.7 Restriktionsverdau der Plasmide

Um eine erfolgreiche Klonierung sicherzustellen, wurde ein Restriktionsverdau nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Da die Insertionsstelle von pCR2.1-TOPO von zwei EcoRI-Erkennungssequenzen flankiert wird, erfolgt ein Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI.

In einem Endvolumen von 50 µl wurden 5 µl Plasmid-DNA mit 5 µl EcoRI-Puffer (10 x) und 5 µl EcoRI (20.000 U / ml) 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurde zum Auftrennen der Fragmente eine Elektrophorese in einem Agarose-Gel (2 %) durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 15 µl der restriktionsverdauten Plasmid-DNA auf einer Mikrotiterplatte mit 1 µl Gelladepuffer gemischt und in eine Geltasche pipettiert. Als DNA-Größenstandard wurde die 123-bp-Leiter eingesetzt. Nach einstündiger Elektrophorese bei 100 V wurde das Gel im UV-Transilluminator ausgewertet.

3.2.7.8 Mutationsanalyse der Klone

Zur Bestätigung der erwarteten Cystein- bzw. Aspartat-Mutation im Kodon 12 der klonierten K-ras-Gene wurde eine quantitative PCR im LightCycler® mit anschließender Genotypisierung der PCR-Produkte durch Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Hierbei wurden der optimierte Reaktionsansatz, jedoch ohne PNA, und die Parameter für die Amplifikationsreaktion verwendet, wie sie in Abschnitt 3.2.5.4 aufgeführt sind. Es wurde jeweils die spezifische LC-Hybridisierungssonde entsprechend der erwarteten K-ras Punktmutation verwendet; das Vorliegen dieser Mutation wird durch den charakteristischen Schmelzpunkt bestätigt. Zur endgültigen Verifizierung der K-ras Punktmutationen in den Plasmiden wurde eine Sequenzierung von der Firma AGOWA GmbH, Berlin, vorgenommen.

3.2.8 Statistische Auswertung

Zur Aufbereitung und statistischen Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurde das Programm SPSS für Windows Version 12.0 (Statistical Package for the Social Sciences) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Methodenbezogene Ergebnisse

4.1.1 Optimierung der quantitativen PCR im LightCycler®

Zur Detektion der K-ras-Punktmutationen vor dem bisweilen weitaus größeren Hintergrund von Wildtyp-Allelen wurde ein hochsensitives Analyseverfahren entwickelt. Bei der quantitativen PCR werden zur Detektion der untersuchten Sequenzen fluoreszenzfarbstoffmarkierte Hybridisierungs sonden verwendet. PNA-Bausteine gestatten bei vollständiger Unterdrückung des Fluoreszenzsignals der Wildtyp-Kopien eine spezifische Messung der mutierten Allele. Durch eine anschließende Schmelzpunktanalyse erfolgt eine Genotypisierung der K-ras Mutation. Die hohen Anforderungen an die Methode setzen einen optimalen Reaktionsablauf voraus. Vor der Untersuchung der klinischen Proben wurden daher zur Optimierung des Verfahrens verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, um die idealen Reaktionsparameter zu ermitteln und so die höchstmögliche Sensitivität zu erreichen.

4.1.1.1 Unterdrückung der Wildtypallel-Fluoreszenz durch PNA

In klinischen Proben ist der Anteil des mutierten K-ras-Gens am Gesamt-K-ras teilweise sehr gering. Zur selektiven Detektion und Quantifizierung der Mutation wird die Bindung der Hybridisierungssonden an die Wildtyp-Allele durch spezifische PNAs unterdrückt, so dass das Fluoreszenzsignal ausschließlich mutierten Allelen entspricht. Die eingesetzte PNA-Menge muss hierbei ausreichend hoch sein, um die dem Wildtyp entsprechende Fluoreszenz komplett zu unterdrücken; eine zu hohe PNA-Konzentration führt jedoch zur Abnahme der Effizienz der PCR.

Außerdem muss sichergestellt werden, dass die Bindung der PNA-Bausteine an die Wildtyp-Zielsequenz vollständig und thermodynamisch stabil erfolgt, um die Bindung der Hybridisierungssonden zu verhindern. Hierzu wurde dem herkömmlichen Ablauf der PCR-Zyklen (Denaturierung der DNA, Annealing mit Anlagerung von Sonden und Primern an die DNA, Extension durch die Polymerase) ein weiterer Schritt hinzugefügt, die PNA-Anlagerung. Diese Hybridisierung des PNA-Oligonukleotids an die homologe DNA-Sequenz (erstes Annealing) muss vor der Primer- und Sondenanlagerung (zweites Annealing) erfolgen. Für das PNA-Annealing gibt es ein

bestimmtes Temperatur- und Zeitoptimum zur bestmöglichen Unterdrückung der Wildtyp-Allel-Fluoreszenz.

4.1.1.1.1 PNA-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Menge PNA wurde anhand einer Mischung von 1 µg humaner Plazenta-DNA (K-ras Wildtyp) und 100 pg DNA aus SW480-Zellen (K-ras Mutation) ein Titrationsversuch durchgeführt, bei dem für die PCR im LightCycler® unterschiedliche PNA-Konzentrationen (0,25 µM, 0,75 µM, 1,25 µM und 2,50 µM) sowie kein PNA eingesetzt wurden. Außerdem wurden eine mutationspositive Kontrolle mit 100 pg DNA aus SW480-Zellen, eine mutationsnegative Kontrolle mit 1 µg humaner Plazenta-DNA, sowie eine Negativkontrolle ohne DNA untersucht. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 4.1, die Parameter der PCR und der anschließenden Schmelzpunktanalyse in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze bei der Titration der PNA-Konzentration.

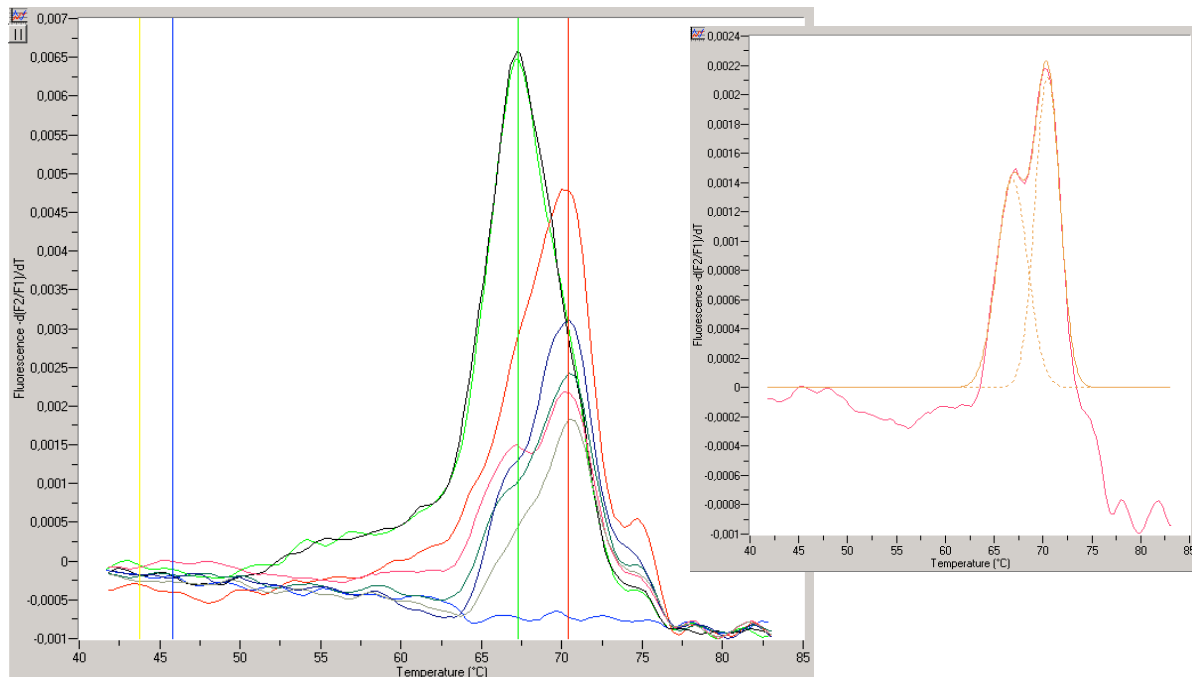
<i>Volumen</i>	<i>Reagenz</i>
2,00 µl	10x PCR-Puffer
1,50 µl	MgCl ₂ (50 mM)
1,00 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,00 µl	Primer K-ras F (10 µM)
1,00 µl	Primer K-ras R (10 µM)
1,00 µl	Ankersonde FL (6 mM)
1,00 µl	Sensorsonde Val-LC (6mM)
0,30 µl	Protein Amplyfly
0,45 µl	Platinum Taq DNA-Polymerase
0,00 – 3,00 µl	DNA (probenabhängig)
0,00 – 1,00 µl	PNA (probenabhängig)
6,75 – 10,75 µl	steriles Wasser zum Auffüllen auf das Endvolumen
<i>20,00 µl</i>	<i>Endvolumen</i>

Tabelle 4.2: Ablauf der PCR und der anschließenden Schmelzpunktanalyse bei der Titration der PNA-Konzentration.

	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Transitionsrate</i>
<i>Initiale Denaturierung</i>	95 °C	3 min	20 °C / s
<i>Amplifikation (45 Zyklen)</i>	Denaturierung	95 °C	10 s
	PNA-Anlagerung	73 °C	10 s
	Primer- / Sondenanlagerung	60 °C	15 s *
	Elongation	72 °C	20 s
<i>Schmelzpunktanalyse</i>	95 °C	20 s	20 °C / s
	40 °C	20 s	20 °C / s
	85 °C	0 s **	0,3 °C / s

*Fluoreszenzmessung am Ende des Reaktionsschrittes; **kontinuierliche Fluoreszenzmessung

Die Ergebnisse der Optimierungsexperimente veranschaulicht Abbildung 4.1. Ohne PNA war die Mutation in Mischung mit K-ras-Wildtyp-Allelen (Verhältnis 1:10.000) in der Schmelzpunktanalyse nicht detektierbar. In Gegenwart von PNA wurde der wildtypentsprechende Scheitelpunkt der Schmelzkurve in Abhängigkeit von der PNA-Konzentration unterschiedlich stark supprimiert. Bei 50 pmol PNA in einem Endvolumen von 20 µl war nur der mutationsspezifische Scheitelpunkt nachweisbar; das Fluoreszenzsignal entspricht hier ausschließlich den mutierten Allelen. Bei niedrigeren PNA-Konzentrationen war die Sondenbindung an die Wildtyp-Sequenz unvollständig unterdrückt. Dies wird an der Schmelzkurve durch eine Schulter in Höhe des Wildtyp-Schmelzpunktes deutlich, die mit steigender PNA-Menge abnimmt. Durch die LightCycler®-Software gelang bei teilweiser Unterdrückung der Sondenbindung in einigen Fällen eine Differenzierung des Wildtyp- und des Mutantenanteils der Schmelzkurve. Eine Quantifizierung der Mutation ist nur bei vollständiger Suppression der Wildtyp-Fluoreszenz durch ausreichend PNA möglich.



- NTC
- 100 pg Val ohne PNA
- 100 pg Val + 1 µg WT + 5 pmol PNA
- 100 pg Val + 1 µg WT + 25 pmol PNA
- 1 µg WT ohne PNA
- 1 µg WT + 100 pg Val ohne PNA
- 100 pg Val + 1 µg WT + 15 pmol PNA
- 100 pg Val + 1 µg WT + 50 pmol PNA

Abbildung 4.1: Optimierung der PNA-Konzentration. Dargestellt ist die Schmelzkurvenanalyse als erste negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur ($-dF/dT$) über der Temperatur. Die senkrechte grüne Linie markiert den charakteristischen Schmelzpunkt des Wildtyps, die senkrechte rote Linie den Schmelzpunkt der Valin-Mutante bei Verwendung des Valin-Sensors.

Bei einem DNA-Gemisch von Mutante und Wildtyp im Verhältnis 1:10.000 ist ohne PNA die Mutation in der Schmelzpunktanalyse nicht detektierbar. Bei Verwendung ansteigender PNA-Mengen wird die Fluoreszenz der Wildtyp-Allele zunehmend supprimiert. Bei unvollständiger Suppression der Sondenbindung an die Wildtyp-DNA weist die Schmelzkurve eine Schulter in Höhe der wildtypspezifischen Temperatur auf. Diese kommt durch Überlagerung der Schmelzkurven der mutationstragenden Allele und der nicht PNA-besetzten Wildtyp-DNA zustande (kleines Bild). Erst bei einer Konzentration von 50 pmol PNA pro 20 µl Reaktionsvolumen wird die Fluoreszenz des K-ras-Wildtyps vollständig supprimiert, so dass das Signal selektiv den mutierten Allelen entspricht.

4.1.1.1.2 PNA-Annealing

Die Bedingungen zur Anlagerung der PNA-Bausteine an die homologe K-ras-Wildtyp-Sequenz wurden anschließend hinsichtlich der Zeit und Temperatur optimiert. Bei einer konstanten Temperatur von 73 °C wurde die Dauer des PNA-Annealings auf 5, 7, 10 und 15 Sekunden verändert. Hierbei wurden die verschiedenen Konzentrationen der Valin-Mutanten-Standardreihe (20 pg bis 100 ng pro Ansatz) jeweils mit 1 µg Wildtyp-DNA und 50 pmol PNA gemischt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die übrigen PCR-Bedingungen entsprachen den oben beschriebenen. Als Negativkontrolle diente DNA-freies Wasser, als Wildtyp-Kontrolle 1 µg humane Plazenta-DNA. Die besten Ergebnisse zeigten sich bei einer Annealingzeit von 7 Sekunden.

Anschließend wurde bei konstanter Dauer von 7 Sekunden die Temperatur der ersten Annealingphase variiert (73, 74, 75, 76 und 77 °C). Eine Temperatur von 76 °C stellte sich als optimal heraus. Durch vollständige Unterdrückung der Sondenbindung an die Wildtyp-Sequenz durch PNA war hierbei in keiner der Proben ein wildtypentsprechender Schmelzpunkt erkennbar. Das der Valin-Mutation entsprechende Schmelzkurvenmaximum war auch bei 20 pg Mutanten-DNA in Gegenwart von 1 µg Wildtyp-DNA nachweisbar.

4.1.1.2 Primer

In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, inwieweit sich die Effizienz der PCR durch eine Veränderung der Primerkonzentration steigern lässt. Hierzu wurden Experimente mit 5, 10, 15 und 20 pmol jedes Primers pro Reaktionsansatz durchgeführt. Exemplarisch wurden 10 ng und 40 pg mutierter DNA aus SW480-Zellen mit jeweils 1 µg Wildtyp-DNA und PNA untersucht. Als Positivkontrolle diente 1 µg humane Plazenta-DNA (Wildtyp), als Negativkontrolle ein Ansatz ohne DNA. Es wurden die zuvor optimierten PNA-Parameter verwendet, die übrigen PCR-Bedingungen entsprachen denen des Optimierungsexperimentes für die PNA-Konzentration. Die softwaregestützte Auswertung zeigte für alle verwendeten Primerkonzentrationen einen ähnlichen Verlauf der Amplifikationsreaktion, wobei mit höheren Primerkonzentrationen etwas höhere Fluoreszenzintensitäten erreicht wurden, besonders beim Vergleich der Proben mit geringer Menge mutierter DNA (siehe Abbildung 4.2a). Bei der Schmelzpunktanalyse zeigte sich der mutationsspezifische Schmelzpunkt bei allen Proben mit 10 ng SW480-DNA unabhängig von der eingesetzten Primermenge. Bei 40 pg Mutanten-DNA waren die Fluoreszenzen sehr gering; hier konnte die LightCycler®-Software die charakteristische Schmelztemperatur am eindeutigsten bei der höchsten untersuchten Primermenge detektieren (siehe Abbildung 4.2b). Für eine hochsensitive Nachweismethode erscheint der Einsatz einer hohen Primerkonzentration sinnvoll.

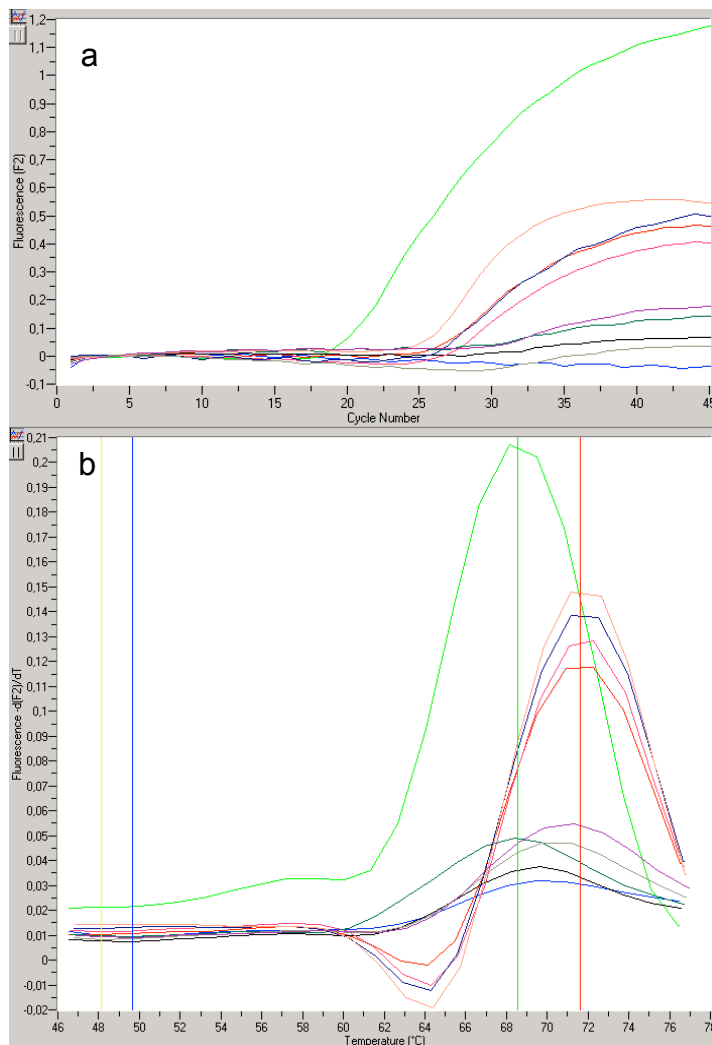


Abbildung 4.2: Optimierung der Primerkonzentration. Es wurde der Einfluss unterschiedlicher Primerkonzentrationen auf den Reaktionsablauf und die Sensitivität des Mutationsnachweises untersucht. Die PCR-Kurven (Abbildungsteil a) zeigen bei der höchsten Primerkonzentration die stärksten Fluoreszenzintensitäten. In Abbildungsteil b ist die Schmelzpunktanalyse im Anschluss an die PCR dargestellt. Bei geringer Konzentration der Mutation ist die für die Valin-Mutante spezifische Schmelztemperatur nur bei einer Primermenge von 20 pmol pro Reaktionsansatz nachweisbar. Für die Negativkontrolle (NTC) und die Wildtyp-Kontrolle wurden je 10 pmol beider Primer pro Ansatz verwendet.

■ NTC
■ 1 µg WT ohne PNA

10 ng Val + 1 µg WT + PNA:
■ je 5 pmol beider Primer
■ je 10 pmol beider Primer
■ je 15 pmol beider Primer
■ je 20 pmol beider Primer

40 pg Val + 1 µg WT + PNA:
■ je 5 pmol beider Primer
■ je 10 pmol beider Primer
■ je 15 pmol beider Primer
■ je 20 pmol beider Primer

Vor dem Hintergrund, dass PNA und Hybridisierungssonden an den Antisense-Strang der amplifizierten DNA binden, wurde im Rahmen der Optimierung mit asymmetrischen Primerkonzentrationen zwischen 5 und 20 pmol experimentiert, um diesen Strang zu bevorzugen. Eine Intensitätssteigerung der Fluoreszenz wurde nicht beobachtet, so dass 20 pmol beider Primer als Optimum der untersuchten Primerkonzentrationen festgelegt wurde.

4.1.1.3 MgCl₂-Konzentration

Der Einfluss der Magnesiumchlorid-Konzentration auf den Ablauf einer PCR ist groß. Magnesiumionen fungieren als Kofaktor der DNA-Polymerase und bilden lösliche Komplexe mit dNTPs. Magnesium wirkt auf die DNA stabilisierend und fördert sowohl die sequenzspezifische als auch die unspezifische Primeranlagerung, so dass hohe Konzentrationen zu weniger spezifischen PCR-Produkten führen. Auch die Bindung der Hybridisierungssonden an ihre Zielsequenz wird durch die Magnesium-

Konzentration beeinflusst. Wird zu viel Magnesium eingesetzt, besteht bei dieser speziellen Methode die Gefahr, dass die Sondenbindung zu thermostabil ist und nicht vollständig durch die PNA-Bausteine unterdrückt werden kann.

Unter Konstanthaltung der übrigen Parameter analog der zuvor beschriebenen Optimierungen wurde die Magnesium-Konzentration variiert (3,75 mM, 5,00 mM, 6,25 mM). Für jede der untersuchten Konzentrationen wurde die PCR mit 10 ng und 40 pg mutationstragender DNA, jeweils in Gegenwart von 1 µg Wildtyp-DNA und 2,5 mM PNA durchgeführt. Die Negativkontrolle enthielt steriles Wasser statt DNA und PNA; in der Wildtyp-Kontrolle waren 1 µg humane Plazenta-DNA, jedoch keine Mutanten-DNA und kein PNA enthalten. Bei der Auswertung der Ergebnisse stellte sich die Magnesium-Konzentration von 3,75 mM als optimal heraus (siehe Abbildung 4.3).

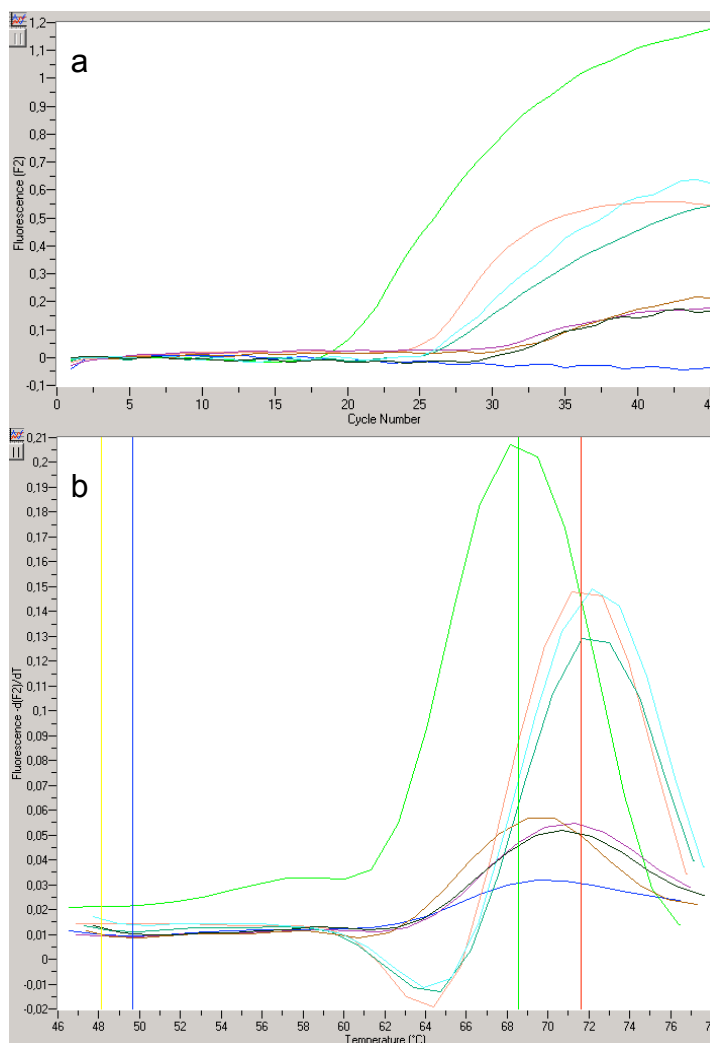


Abbildung 4.3: Optimierung der MgCl₂-Konzentration.

Unter Konstanthaltung der übrigen PCR-Bedingungen wurden drei verschiedene MgCl₂-Konzentration (3,75 mM, 5 mM und 6,25 mM) getestet. Der typische sigmoide Verlauf der PCR-Kurven ist bei einer MgCl₂-Konzentration von 3,75 mM am besten zu erkennen (Abbildungsteil a).

In der Schmelzkurvenanalyse (Abbildungsteil b) zeigt sich bei 3,75 mM MgCl₂ für 10 ng und 40 pg Mutanten-DNA das Schmelzkurvenmaximum bei nahezu gleicher Temperatur (rote senkrechte Linie). Bei 5 mM und 6,25 mM MgCl₂ weichen die Schmelztemperaturen stärker voneinander ab.

MgCl₂ 3,75 mM:

■ NTC

■ WT ohne PNA

■ 10 ng Val + 1 µg WT + PNA

■ 40 pg Val + 1 µg WT + PNA

MgCl₂ 5,00 mM:

■ 10 ng Val + 1 µg WT + PNA

■ 40 pg Val + 1 µg WT + PNA

MgCl₂ 6,25 mM:

■ 10 ng Val + 1 µg WT + PNA

■ 40 pg Val + 1 µg WT + PNA

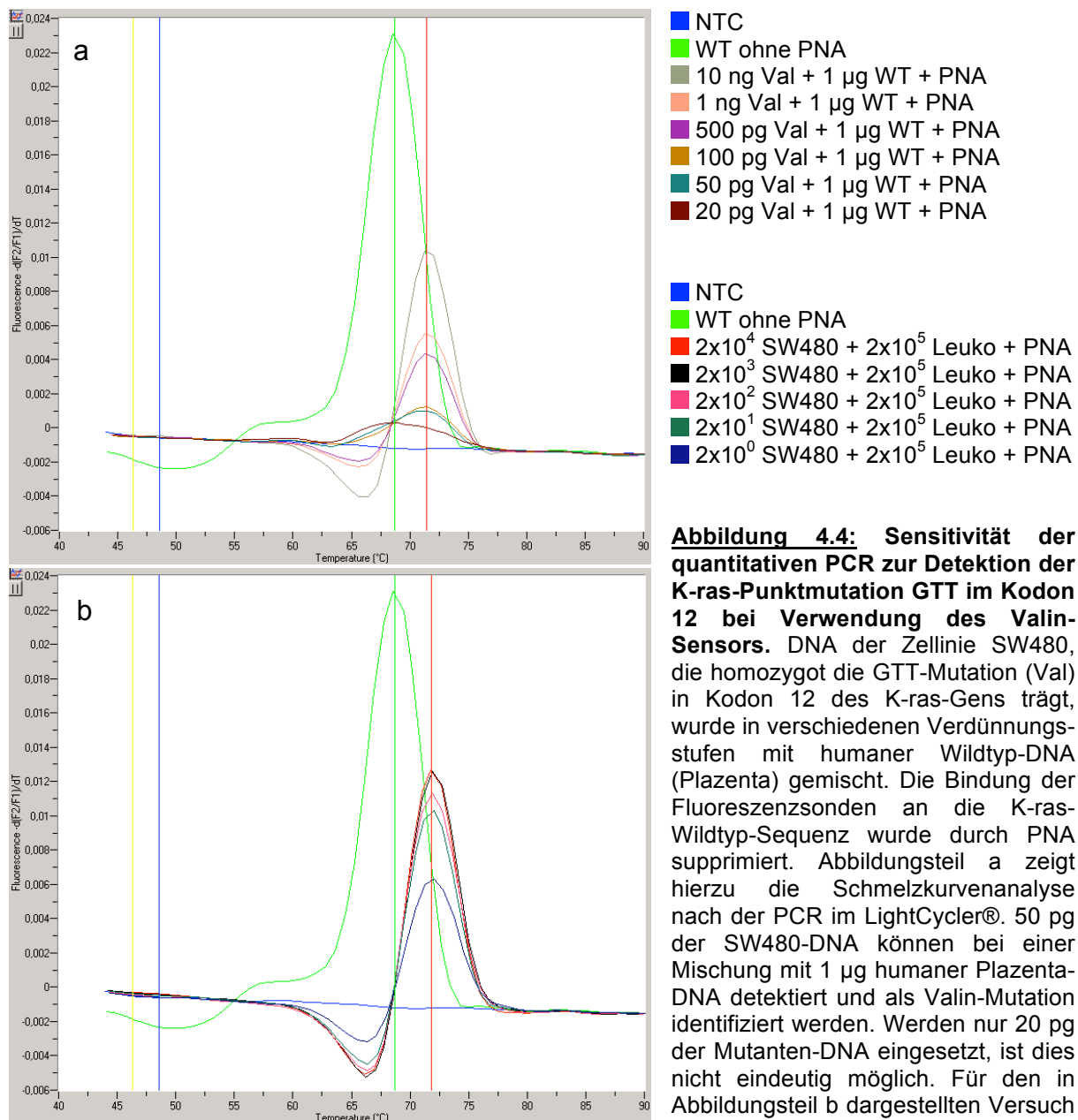
4.1.2 Sensitivität der optimierten quantitativen PCR

Im Anschluss an die Optimierungsarbeiten wurde die Sensitivität der LightCycler®-PCR mit Hybridisierungs sonden und PNA beim Nachweis von K-ras-Mutationen im Kodon 12 überprüft. Die Eignung zur Quantifizierung der Mutationen erfolgte separat für jede der spezifischen Hybridisierungs sonden für die drei Einzelbasenaustausche der Wildtyp-Sequenz GGT (Glycin) zu GTT (Valin), TGT (Cystein) und GAT (Aspartat).

Für die Evaluierung der Methode bei Verwendung des Valin-Sensors wurden verschiedene DNA-Mengen aus SW480-Zellen eingesetzt, die die GTT-Mutation in Kodon 12 homozygot tragen. Jeweils 10 ng, 1 ng, 500 pg, 100 pg, 50 pg und 20 pg der Mutanten-DNA wurden mit 1 µg humaner Plazenta-DNA (K-ras-Wildtyp) gemischt und die Messung unter den optimierten Reaktionsbedingungen in Gegenwart von 50 nmol wildtypspezifischer PNA durchgeführt. Bei einem angenommenen DNA-Gehalt von 6 pg pro Zelle entsprechen 20 pg rechnerisch etwa 7 Kopien und 1 µg 333.333 Kopien des K-ras-Gens ($1:2 \times 10^5$). Um die Bedingungen der klinischen Proben genauer zu imitieren, wurden außerdem jeweils 2×10^6 Leukozyten eines mutationsnegativen Spenders mit unterschiedlichen Anzahlen SW480-Zellen (2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , sowie 2×10^1) gemischt und aus dem Zellgemisch DNA isoliert. Dabei wurde entsprechend der Verfahrensweise für klinischen Proben vorgegangen; anschließend wurde jeweils 1/10 des DNA-Eluats mittels PCR untersucht, auch hier wurden 50 nmol PNA je Probe verwendet. Im Falle des kleinsten Verhältnisses mutierter Zellen zum Wildtyp wurden in die PCR also rechnerisch 4 Mutantenkopien und 400.000 Kopien des Wildtyps eingesetzt ($1:10^5$). Als mutationsnegative Kontrolle diente humane Plazenta-DNA, als Negativkontrolle steriles Wasser, jeweils ohne PNA.

Die Genotypisierung wurde durch Schmelzpunktanalyse im Anschluss an die PCR durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Unter Verwendung der spezifischen Sonde für die GTT-Mutation (Valin-Sensor) ergaben sich Schmelztemperaturen von 68,71 °C für den Wildtyp und 71,44 °C für die Valin-Mutation. Es konnten 50 pg der DNA mit K-ras-Mutation vor einem Hintergrund von 1 µg Wildtyp-DNA (siehe Abbildung 4.4a) bzw. 2 mutationstragende Zellen in Gegenwart von 200.000 Wildtyp-Leukozyten (siehe Abbildung 4.4b) sicher detektiert werden. Bei der Untersuchung von 20 pg Mutanten-DNA entsprach das Schmelzkurvenmaximum nicht der für die Valin-Mutante spezifischen Temperatur, so

dass eine Genotypisierung hier nur unter Vorbehalt möglich ist. Bei dem in Abbildung 4.4a dargestellten Versuch würde man bei der Kurve für 20 pg mutationstragender DNA den K-ras-Wildtyp vermuten. Zusammenfassend liegt die Sensitivität der optimierten Analysemethode beim Nachweis der Valin-Mutation zwischen 1×10^{-5} und 5×10^{-5} .



verwendet, das in unterschiedlichen Verhältnissen SW480-Zellen und mutationsnegative Leukozyten (Leuko) enthielt. Hier lassen sich noch 4 Kopien des Gens mit der GTT-Mutation zwischen 400.000 Kopien des K-ras-Wildtyps eindeutig nachweisen. Dies entspricht einer Sensitivität von 1×10^{-5} .

Da MiaPaCa 2- (K-ras-Kodon-12-Sequenz TGT, kodiert für Cystein) und Panc1-Zellen (GAT, Aspartat) nicht strikt diploid sind, war keine direkte Erstellung von

Standardreihen aus isolierter genomischer DNA möglich. Um definitive Aussagen über die Anzahl der eingesetzten Kopien treffen zu können, war zunächst eine Klonierung der K-ras-Gene notwendig. Zur Amplifikation der klonierten Plasmid-DNA wurden Bakterien zunächst transformiert und anschließend über Nacht kultiviert. Nach Präparation der Plasmide erfolgte die Verifizierung des inserierten K-ras-Genes und der jeweiligen Mutation. Die Plasmide wurden im Spektralphotometer quantifiziert und Standardreihen mit 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 5×10^1 , sowie 2×10^1 Kopien des K-ras-Genes erstellt. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 3 ausführlich dargestellt.

Analog zur Sensitivitätsbestimmung bei Verwendung des Valin-Sensors wurden Untersuchungen mit der Cystein- bzw. Aspartat-Sonde und der jeweils entsprechenden Standardreihe durchgeführt. Die einzelnen Verdünnungsstufen der Mutanten-DNA wurden mit je 1 μg humaner Plazenta-DNA und 50 nmol wildtypspezifischer PNA gemischt und die Messungen unter den optimierten PCR-Bedingungen durchgeführt. Die Wildtyp-Kontrolle und die Negativkontrolle enthielten 1 μg humane Plazenta-DNA bzw. DNA-freies Wasser und kein PNA. Bei Verwendung der Aspartat-Sonde lag der Schmelzpunkt der Wildtyp-DNA bei $67,06^\circ\text{C}$, der der GAT-Mutante bei $70,67^\circ\text{C}$. Es konnten 20 mutierte Kopien in Gegenwart von 333.333 Wildtyp-Kopien nachgewiesen werden; die Sensitivität beträgt also mindestens 6×10^{-5} (Abbildung 4.5). Wurde der Cystein-Sensor verwendet, so zeigte die TGT-Mutante einen Schmelzpunkt von $70,94^\circ\text{C}$, die Schmelztemperatur der Wildtyp-DNA betrug hier $67,31^\circ\text{C}$. Als kleinste Menge ließen sich 50 mutierte Kopien in Gegenwart von 1 μg Wildtyp-DNA nachweisen, entsprechend einer Sensitivität von $1,5 \times 10^{-4}$ (Abbildung 4.6).

Das LightCycler®-Verfahren erlaubt eine Quantifizierung des untersuchten Gens in den Proben. Hierzu wird eine Standardreihe bekannter DNA-Mengen verwendet. Die gerätespezifische Software erstellt aus den bei der Amplifikationsreaktion gemessenen Fluoreszenzwerten dieser Verdünnungsreihe eine Standardgerade, mit Hilfe derer sich der DNA-Gehalt anderer Proben ermitteln lässt. Bei Verwendung der Valin- und Aspartat-Sonden zeigte sich hierbei auch für niedrige Kopienzahlen reproduzierbar eine hohe Genauigkeit der Messwerte, während beim Cystein-Sensor die durch die Software errechnete Kopienzahl teilweise stärker von der theoretischen abwich (siehe Abbildung 4.7).

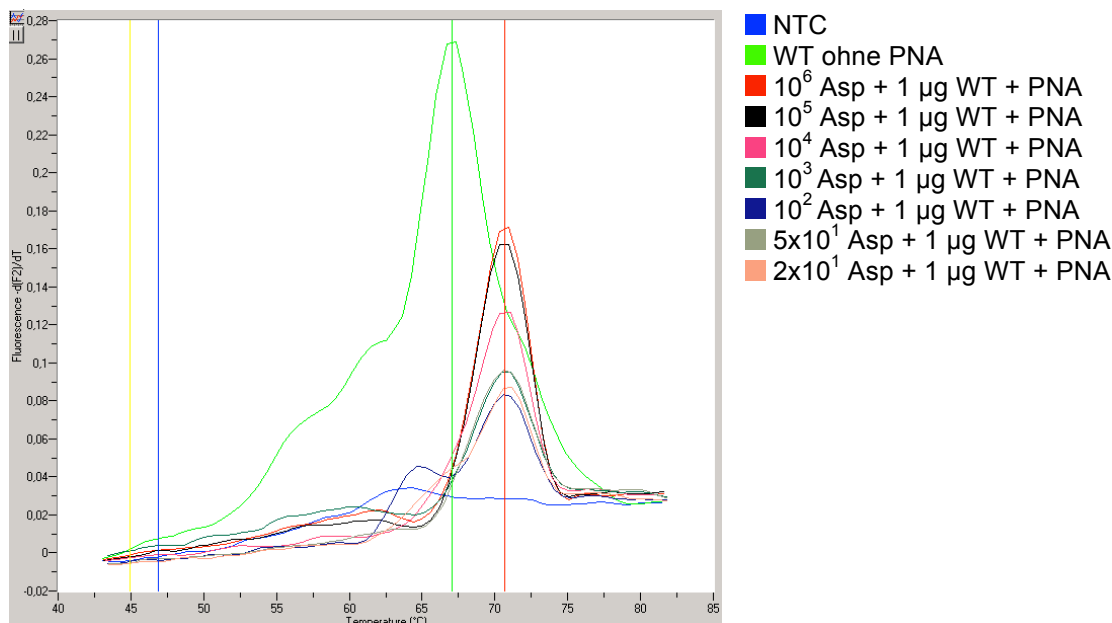


Abbildung 4.5: Sensitivität der quantitativen PCR zur Detektion der K-ras-Punktmutation GAT im Kodon 12 bei Verwendung des Aspartat-Sensors. Verschiedene Kopienzahlen eines Plasmids mit der Aspartat-Mutation des K-ras-Gens in Kodon 12 wurden mit Wildtyp-DNA gemischt. Die PCR wurde im LightCycler® durchgeführt. In der dargestellten Schmelzkurvenanalyse zeigte sich bei den PNA-haltigen Proben kein dem Wildtyp entsprechendes Maximum der Schmelzkurve. Dies ist bedingt durch die vollständige Verhinderung der Hybridisierungs-sondenbindung an die Wildtyp-Allele. Die mutationsspezifischen Schmelzpunkte sind bei den entsprechenden Proben deutlich erkennbar. Die Sensitivität des Mutationsnachweises beträgt 6×10^{-5} .

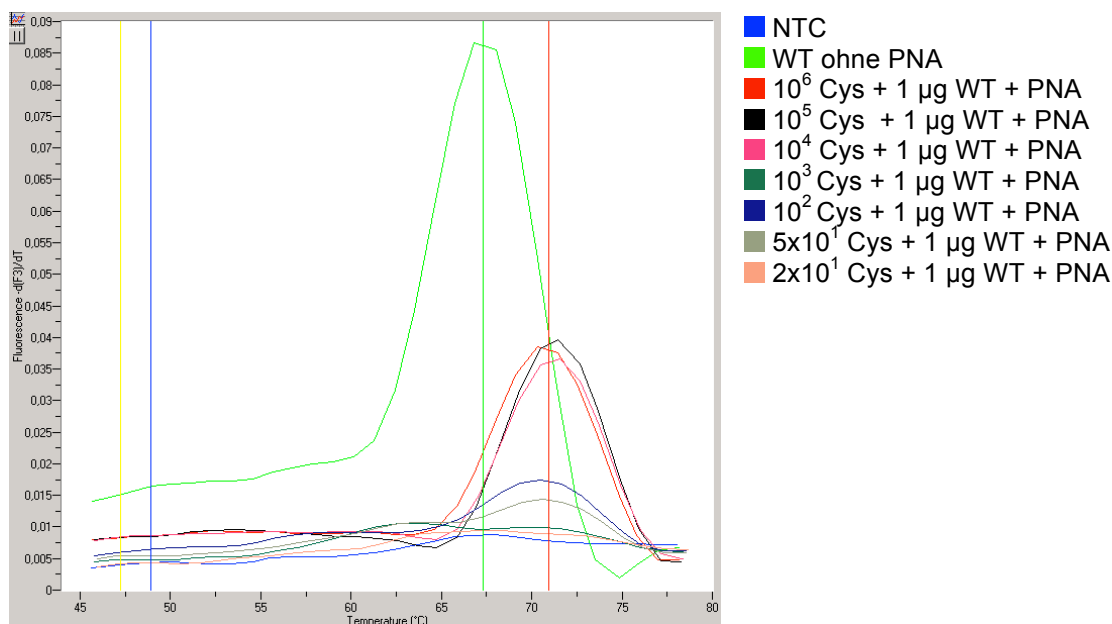
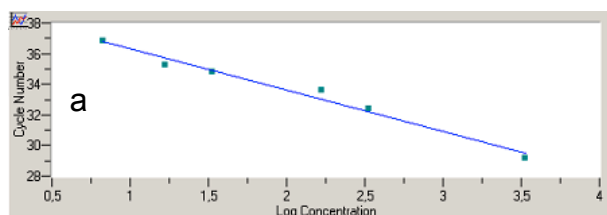
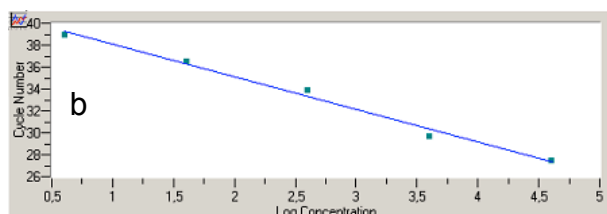


Abbildung 4.6: Sensitivität der quantitativen PCR zur Detektion der K-ras-Punktmutation TGT im Kodon 12 bei Verwendung des Cystein-Sensors. Analog zu Sensitivitätsuntersuchung der Aspartat-Mutation wurde Plasmid-DNA, die für die Cystein-Mutation des K-ras-Gens kodiert, in unterschiedlichen Verdünnungsstufen mit humaner Wildtyp-DNA gemischt. In 1 μg Wildtyp-DNA entsprechen 50 nachweisbaren Kopien der Mutante einer Sensitivität von $1,5 \times 10^{-4}$. Der Nachweis von 20 Kopien des mutierten Gens gelang nicht. Bei 10^3 eingesetzten Kopien des Plasmids war im gezeigten Versuch ebenfalls kein Schmelzpunkt detektierbar.



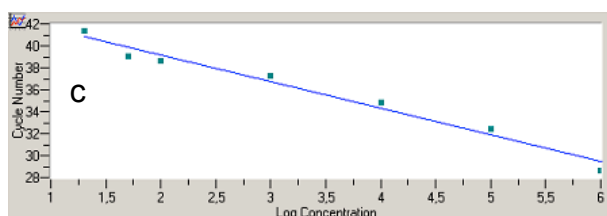
Steigung = -2,689; Fehler** = 0,139; r*** = -0,99

Standard	Kopien (vorgegeben)	Kopien (errechnet)	CP*
Val 10 ng	$3,333 \times 10^3$	$4,464 \times 10^3$	29,19
Val 1 ng	$3,333 \times 10^2$	$2,838 \times 10^2$	32,41
Val 500 pg	$1,667 \times 10^2$	$9,977 \times 10^1$	33,63
Val 100 pg	$3,333 \times 10^1$	$3,633 \times 10^1$	34,81
Val 50 pg	$1,667 \times 10^1$	$2,374 \times 10^1$	35,31
Val 20 pg	$6,667 \times 10^0$	$6,299 \times 10^0$	36,86



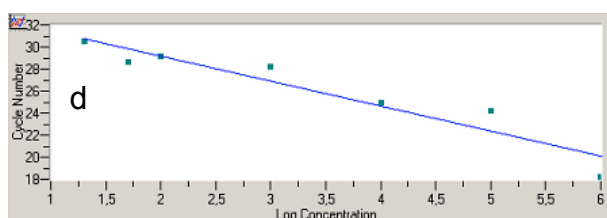
Steigung = -2,985; Fehler** = 0,190; r*** = -0,99

Standard	Kopien (vorgegeben)	Kopien (errechnet)	CP*
2×10^4 SW480	$4,000 \times 10^4$	$3,629 \times 10^4$	27,45
2×10^3 SW480	$4,000 \times 10^3$	$6,517 \times 10^3$	29,67
2×10^2 SW480	$4,000 \times 10^2$	$2,536 \times 10^2$	33,88
2×10^1 SW480	$4,000 \times 10^1$	$3,396 \times 10^1$	36,49
2×10^0 SW480	$4,000 \times 10^0$	$5,028 \times 10^0$	38,96



Steigung = -2,428; Fehler** = 0,231; r*** = -0,99

Standard	Kopien (vorgegeben)	Kopien (errechnet)	CP*
10^6 Asp	$1,000 \times 10^6$	$2,059 \times 10^6$	28,68
10^5 Asp	$1,000 \times 10^5$	$6,146 \times 10^4$	32,38
10^4 Asp	$1,000 \times 10^4$	$5,938 \times 10^3$	34,85
10^3 Asp	$1,000 \times 10^3$	$6,087 \times 10^2$	37,25
10^2 Asp	$1,000 \times 10^2$	$1,663 \times 10^2$	38,62
5×10^1 Asp	$5,000 \times 10^1$	$1,067 \times 10^2$	39,08
2×10^1 Asp	$2,000 \times 10^1$	$1,232 \times 10^1$	41,36



Steigung = -2,260; Fehler** = 0,462; r*** = -0,95

Standard	Kopien (vorgegeben)	Kopien (errechnet)	CP*
10^6 Cys	$1,000 \times 10^6$	$7,343 \times 10^6$	18,17
10^5 Cys	$1,000 \times 10^5$	$1,559 \times 10^4$	24,21
10^4 Cys	$1,000 \times 10^4$	$7,626 \times 10^3$	24,91
10^3 Cys	$1,000 \times 10^3$	$2,643 \times 10^2$	28,21
10^2 Cys	$1,000 \times 10^2$	$1,007 \times 10^2$	29,16
5×10^1 Cys	$5,000 \times 10^1$	$1,711 \times 10^2$	28,64
2×10^1 Cys	$2,000 \times 10^1$	$2,509 \times 10^1$	30,52

Abbildung 4.7: Quantifizierung der K-ras-Mutationen mittels quantitativer PCR: Ergebnisse nach Optimierung des Verfahrens. Die LightCycler®-Software bestimmt für jede Probe den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen hinaus zu steigen beginnt (sogenannter Kreuzungspunkt, engl. Crossing point). Die Software trägt die Kreuzungspunkte der Standardreihe über dem Logarithmus der vorgegebenen Standardkonzentrationen ab (in der Grafik als grüne Quadrate dargestellt, sowie als Zahlenwerte in der Tabelle angegeben). Durch lineare Regression durch die Datenpunkte wird eine Standardgerade (blaue Linie) erstellt, die nun die Errechnung der Anfangskopienzahl anderer Proben erlaubt. Die mathematischen Parameter der Standardgeraden und der Vergleich der vorgegebenen und der anhand der Regressionsgeraden berechneten Kopienzahlen der Standardwerte erlauben Aussagen über die PCR-Effizienz, systematische und stochastische Fehler.

Abgebildet sind die Standardgeraden, die bei den Sensitivitätsuntersuchungen der quantitativen PCR bezüglich der Kodon 12-Mutationen GTT (Valin, Abbildungsteil a und b), GAT (Aspartat, Abbildungsteil c) und TGT (Cystein, Abbildungsteil d) des K-ras-Gens erstellt worden sind. Die Geraden zeigen eine gute Quantifizierungsgenauigkeit der Valin- und der Aspartat-Mutationen bei Verwendung der entsprechenden Sonden. Für die Cystein-Mutation sind quantitative Aussagen nur mit geringerer Präzision möglich.

Die vorgegebene Kopienzahl für den in Abbildungsteil a dargestellten Versuch ergibt sich unter der Annahme, dass eine humane Zelle 6 pg DNA enthält. Die errechneten Kopienzahlen ergeben sich nach der Standardgeraden aus den Kreuzungspunkten der Proben.

*CP: Kreuzungspunkt (Crossing point). **Fehler: mittleres vertikales Abstandsquadrat der Datenpunkte von der Regressionsgeraden. ***r: Regressionskoeffizient.

4.1.3 Variabilität der sequenzabhängigen Schmelztemperaturen

Zur Genotypisierung wird im Anschluss an die quantitative PCR eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Bei einer bestimmten Temperatur wird durch die zugeführte thermische Energie die Bindungsenergie der Hybridisierungs sonden überwunden, und es kommt durch Dissoziation der Sonden von ihrer Zielsequenz zu einem rapiden Abfall der Fluoreszenzintensität. Die jeweilige Schmelztemperatur hängt von der Bindungsenergie und damit vom Grad der Basenübereinstimmung zwischen Sonden- und DNA-Sequenz ab. Die Schmelzpunkte sind experimentell nicht exakt reproduzierbar, sondern streuen um einen bestimmten Mittelwert. Für die drei verwendeten mutationsspezifischen Sonden wurde durch Auswertung mehrerer Wiederholungsexperimente die Variabilität der sequenzabhängigen Schmelztemperaturen des K-ras-Wildtyps und der jeweiligen Mutation untersucht. Eine Übersicht über die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.3.

Tabelle 4.3: Schmelztemperaturen der Hybridisierungssonden für K-ras-Wildtyp und die jeweilige Mutation

	<i>n</i> *	<i>Schmelztemperatur (Wildtyp)</i>		<i>Schmelztemperatur (Mutation**)</i>	
		<i>Mittelwert</i> ***	<i>s</i> ****	<i>Mittelwert</i> ***	<i>s</i> ****
<i>Val-Sensor</i>	10	68,21 °C	0,58 °C	71,13 °C	0,32 °C
<i>Asp-Sensor</i>	5	67,26 °C	0,23 °C	70,72 °C	0,14 °C
<i>Cys-Sensor</i>	4	67,19 °C	0,17 °C	70,98 °C	0,17 °C

*Anzahl der in die Berechnung einfließenden Experimente. **Die angegebenen Werte beziehen sich jeweils auf die K-ras-Mutation mit der zur Hybridisierungssonde vollständig homologen Sequenz. ***arithmetischer Mittelwert. ****Standardabweichung.

4.1.4 Nachweis von K-ras-Mutationen mit einer etablierten Methode: Enriched BstNI RFLP / PCR

Die Enriched BstNI RFLP / PCR wurde durch Mora und Mitarbeiter für einen Nachweis von Mutationen im K-ras-Kodon 12 in DNA aus Feinnadel-Aspiraten von Pankreaskarzinomen eingesetzt [74].

Für eine Vergleichbarkeit der Sensitivität der LightCycler®-PCR mit Hybridisierungssonden und PNA mit der Sensitivität dieser etablierten Methode wurden bei beiden Methoden die gleichen DNA-Proben eingesetzt (vergleiche Kapitel 4.1.2): Einerseits wurden Mischungen aus verschiedenen DNA-Mengen aus SW480-Zellen (10 ng, 1 ng, 500 pg, 100 pg, 50 pg und 20 pg, GTT-Mutation in K-ras-

Kodon 12) mit humaner Plazenta-DNA (jeweils 1 μg , K-ras-Wildtyp) für die Messung verwendet, andererseits DNA aus Zellgemischen von SW480-Zellen (2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 und 2×10^1) und mutationsnegativen Leukozyten (2×10^6). Als mutationsnegative Kontrolle wurde humane Plazenta-DNA, für die Negativkontrolle steriles Wasser eingesetzt.

In der Enriched BstNI RFLP / PCR war die K-ras-Mutation noch bei einer Mischung von 1 ng mutationstragender SW480-DNA mit 1 μg der Wildtyp-DNA, bzw. bei Einsatz der DNA aus einem Gemisch von 2×10^3 SW480-Zellen mit 2×10^6 normalen Leukozyten nachweisbar, entsprechend einer Sensitivität von 1×10^{-3} (siehe Abbildung 4.8). Dies entspricht einer Sensitivität wie sie für die Methode auch von Mora et al. genannt wird [74].

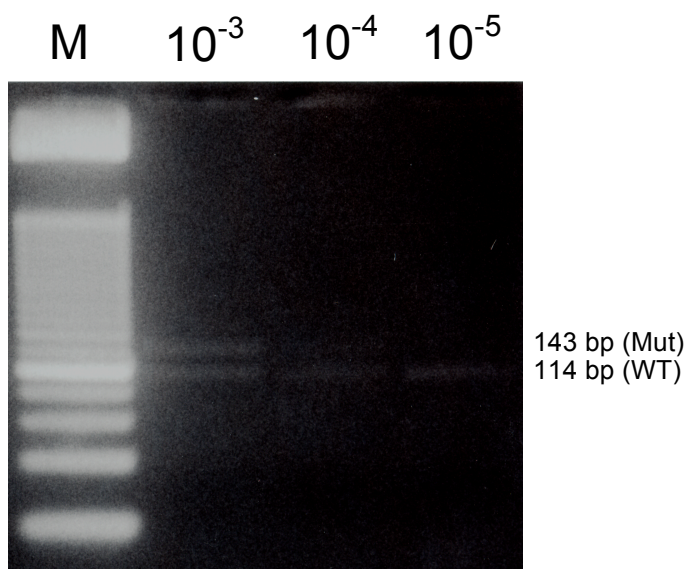


Abbildung 4.8: Nachweis von K-ras-Mutationen mittels Enriched BstNI RFLP / PCR. Bei der Enriched BstNI RFLP / PCR [74] ergibt sich in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese für das K-ras-Wildtypallel (WT) und für das mutierte Allel (Mut) jeweils eine Bande (Wildtyp: 114 bp, Mutation: 143 bp). Wird DNA aus einem Zellgemisch aus 2×10^3 SW480-Zellen (Mutation im K-ras-Kodon 12: GGT [Glycin] \rightarrow GTT [Valin]) und 2×10^6 mutationsnegativen Leukozyten mit Hilfe dieser Methode untersucht, so sind im Agarose-Gel beide Banden nachweisbar (10^{-3}). Bei einem geringen Anteil SW480-Zellen gelingt der Mutationsnachweis mit der BstNI RFLP / PCR nicht: Wird DNA aus einem Zellgemisch von 2×10^2 oder 2×10^1 SW480-Zellen und 2×10^6 mutationsnegativen Leukozyten (10^{-4} bzw. 10^{-5}) eingesetzt, ist nur die dem K-ras-Wildtyp entsprechende Bande nachweisbar. Vergleichbare Sensitivitäten ergeben sich, wenn nicht DNA aus Zellgemischen eingesetzt wird, sondern DNA aus SW480-Zellen und DNA aus Leukozyten (K-ras-Wildtyp) in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt werden (nicht gezeigt).

4.2 Patientenbezogene Ergebnisse

4.2.1 Basisdaten der untersuchten Patienten

Es wurden insgesamt 257 Blutproben von 31 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie untersucht, die zwischen Oktober 2002 und Dezember 2003 in der Medizinischen Klinik m. S. Hämatologie und Onkologie am Campus Virchow-Klinikum der Charité stationär behandelt wurden. Von den in die Studie eingeschlossenen Patienten waren 18 (58,1%) weiblichen und 13 (41,9%) männlichen Geschlechts. Bei 29 Patienten (93,5%) erfolgte der Einschluss in die Studie bei erstmalig diagnostizierter Leukämie, bei zwei Patienten (6,5%) während eines Rezidivs der Erkrankung. Das mediane Alter der Patienten mit erstdiagnostizierter AML lag bei 50,8 Jahren (Minimum 25,9 Jahre, Maximum 73,0 Jahre, Standardabweichung 13,0 Jahre). In sechs Fällen waren vor Erstdiagnose der AML ein myelodysplastisches Syndrom, eine erhöhte medizinische oder zivilisatorische Strahlenbelastung, eine vorausgegangene Chemotherapie einer anderen malignen Erkrankung oder eine Kombination dieser Risikofaktoren bekannt, so dass diese Fälle als sekundäre AML gewertet wurden. Die Verteilung der Fälle bezüglich FAB-Subtyp und zytogenetischer Aberrationen zeigt Tabelle 4.3.

Tabelle 4.3: FAB-Einteilung¹ und Zytogenetik².

	M0	M1	M2	M3	M4	M4eo	M5a	M5b	M6	M7	k. A.	Σ
<i>Normaler Karyotyp</i>	1	4	5	-	2	-	-	2	2	-	-	16
<i>zytogenet. Aberrationen</i>	1	-	3	-	1	1	1	2	-	-	1	10
<i>keine Angaben</i>	-	1	2	-	-	1	-	-	-	-	1	5
Σ	2	5	10	0	3	2	1	4	2	0	2	31

¹Subtyp der AML nach FAB-Klassifikation. ²nach dem Ergebnis der prätherapeutischen zytogenetischen Untersuchung der malignen Zellen; die im Einzelfall vorliegenden Aberrationen sind der Tabelle 4.4 zu entnehmen. k. A.: keine Angaben.

Der Blastengehalt des Knochenmarks wurde bei Diagnosestellung zytologisch oder mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach dem ersten Zyklus der unterschiedlichen Induktions- bzw. Rezidivchemotherapien (siehe Tabelle 4.4) erfolgte erneut die Überprüfung des Blastengehaltes des Knochenmarks. Kriterium für eine komplette Remission war ein Blastenanteil von unter 5 % im Knochenmark bei normalem Blutbild. Dies war bei 22 Patienten (70,9 %) nach dem ersten

Therapiezyklus der Fall, vier Patienten (12,9 %) zeigten kein entsprechendes Ansprechen auf die Chemotherapie. Bei den restlichen fünf Patienten (16,1 %) liegen hierzu keine Angaben vor. Der weitere Krankheitsverlauf wurde im Median für 51 Wochen nach Einschluss in die Untersuchung beobachtet, die einzelnen Beobachtungszeiträume liegen zwischen minimal drei und maximal 118 Wochen. In dieser Zeit kam es bei neun Patienten (29,0 %) nach einem medianen Intervall von 28 Wochen zu einem Rezidiv der Erkrankung, das kleinste beobachtete rezidivfreie Intervall lag hierbei bei drei Wochen, das späteste beobachtete Rezidiv trat 62 Wochen nach vorausgegangener kompletter Remission auf. Am Ende des Beobachtungszeitraumes lebten noch 27 der 31 Patienten (87,1 %). Sämtliche beobachtete Todesfälle traten nach einem Rezidiv der AML auf. Die mediane Überlebenszeit der verstorbenen Patienten betrug 41 Wochen nach Erstdiagnose. Der Patient mit der kürzesten beobachteten Überlebenszeit von 31 Wochen zeigte auch das schlechteste Ansprechen auf den ersten Zyklus der Induktionschemotherapie und mit 14 Wochen das kürzeste rezidivfreie Intervall der vier Patienten mit letalem Ausgang der Erkrankung. Eine Übersicht über die 31 Patienten zeigt Tabelle 4.4.

Tabelle 4.4: Synopsis der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie.

Pat. Nr.	w/m ¹	Alter ²	Phase ³	sekund. ⁴	FAB ⁵	Zytogenetik ⁶	Chemo. ⁷	CR ⁸	Rezidiv ⁹	Beob. ¹⁰	K-ras ¹¹
1	W	27,1	Erst	-	M0	normal	HAM	Nein	-	74	WT
2	M	67,8	Erst	M	M2	+8	HAM	Nein	3	32	WT
3	W	30,3	Erst	-	M5b	komplex	7+3	Ja	-	66	WT
4	W	73,0	Erst	-	M4eo	k. A.	k. A.	k. A.	-	3	Mut
5	M	63,8	Erst	-	M2	normal	TAD	Nein	14	31 †	WT
6	M	55,2	Erst	-	M2	normal	TAD	Ja	-	86	WT
7	M	63,0	Erst	-	M0	+8	HAM	Ja	-	20	Mut
8	W	51,4	Rezidiv	-	M2	normal	S-HAI	k. A.	62	108	WT
9	W	40,7	Erst	R	M4eo	inv(16)	TAD	k. A.	-	61	Mut
10	M	53,7	Rezidiv	-	M2	k. A.	HAM	k. A.	-	109	WT
11	W	47,4	Erst	R	M5b	normal	TAD	Ja	-	94	WT
12	W	30,6	Erst	-	M4	normal	TAD	Ja	-	47	WT
13	W	58,2	Erst	-	M2	del(9)(25)	HAM	Ja	31	80	WT
14	M	43,0	Erst	-	M6	normal	TAD	Ja	-	118	WT
15	M	63,2	Erst	-	M5a	+8	HAM	Ja	28	55 †	Mut
16	W	68,2	Erst	-	M1	normal	TAD	Ja	-	15	WT
17	M	58,3	Erst	-	M4	normal	HAM	Ja	-	41	Mut
18	W	53,6	Erst	R, C	M4	komplex	7+3	Ja	30	46 †	WT
19	W	45,0	Erst	-	M1	normal	TAD	k. A.	-	66	Mut
20	W	67,8	Erst	M	k. A.	k. A.	HAM	Ja	-	34	WT
21	W	40,5	Erst	-	M5b	normal	TAD	Ja	-	58	WT
22	W	52,6	Erst	-	M1	normal	TAD	Ja	-	51	WT
23	M	48,7	Erst	-	M1	normal	HAM	Ja	-	113	Mut
24	W	25,9	Erst	-	M2	normal	HAM	Ja	-	28	WT
25	M	40,7	Erst	-	M5b	t(11;19)	HAM	Ja	-	84	WT
26	M	40,6	Erst	-	M6	normal	TAD	Ja	-	16	WT
27	M	44,2	Erst	-	M1	k. A.	TAD	Nein	30	43	WT
28	M	65,8	Erst	-	M2	normal	HAM	Ja	11	22	Mut
29	W	50,8	Erst	-	M2	k. A.	HAM	Ja	-	45	Mut
30	W	61,6	Erst	-	M2	komplex	TAD	Ja	28	36 †	WT
31	W	45,5	Erst	M, R, C	k. A.	+6	TAD	Ja	-	98	WT

¹Geschlecht des Patienten (w: weiblich, m: männlich).

²Alter des Patienten in Jahren bei Erstdiagnose bzw. Diagnose des Rezidivs.

³Krankheitsphase bei Einschluss in die Untersuchung (Erst: Ersterkrankung, Rezidiv: Rezidivkrankung).

⁴anamnestischer Hinweis auf eine sekundäre Leukämie (M: Myelodysplastisches Syndrom, R: Radiatio, C: Chemotherapie einer anderen malignen Erkrankung, -: kein Hinweis auf eine sekundäre AML).

⁵Subtyp der AML nach FAB-Klassifikation.

⁶Ergebnis der zytogenetischen Untersuchung der malignen Zellen (normal: normaler Karyotyp 46,XX oder 46,XY; inv: Inversion; del: Deletion; t: Translokation; +: Trisomie des angegebenen Chromosoms; komplex: komplexe Anomalien).

⁷Chemotherapie-Schema im ersten Zyklus der Induktions- bzw. Rezidivtherapie (HAM: Ara-C, Mitoxantron; TAD: Thioguanin, Ara-C, Daunorubicin; 7+3: Ara-C, Daunorubicin; S-HAI: Ara-C, Idarubicin, G-CSF).

⁸Komplette Remission nach dem ersten Zyklus der Chemotherapie (Induktions- bzw. Rezidivtherapie).

⁹Rezidiv der AML innerhalb des Beobachtungszeitraumes, Angabe des rezidivfreien Intervalls nach kompletter Remission in Wochen; -: kein Rezidiv innerhalb des Beobachtungszeitraumes.

¹⁰Beobachtungsdauer nach Erstdiagnose bzw. Rezidiv-Diagnose (je nach Krankheitsphase bei Einschluss in die Untersuchung) in Wochen; entspricht dem Zeitraum zwischen Diagnosestellung und letztem Klinikaufenthalt oder Ambulanztermin des Patienten (†: Tod des Patienten am Ende des Beobachtungszeitraumes).

¹¹Ergebnis der K-ras-Mutationsanalyse im Verlauf (WT: im Verlauf ausschließlich Nachweis von K-ras-Wildtyp, Mut: Nachweis von K-ras-Mutationen).

k. A. : keine Angaben.

4.2.2 Nachweis von K-ras-Mutationen im Blut

Die Patienten wurden bei Erstdiagnose einer akuten myeloischen Leukämie bzw. bei Diagnose eines Krankheitsrezidivs einer vorbekannten AML in diese Untersuchung eingeschlossen. Blutentnahmen wurden bei Studieneinschluss und im weiteren Verlauf bei stationärem Aufenthalt der Patienten in wöchentlichem Abstand durchgeführt. Insgesamt wurden 257 Blutproben asserviert. 48 Proben (18,7 %) wurden den Patienten während einer akuten Krankheitsphase (Erst- oder Rezidivkrankung) abgenommen, 209 Blutentnahmen (81,3 %) erfolgten im Intervall einer kompletten Krankheitsremission nach Chemotherapie. Pro Patient wurden median 7 Blutproben (Minimum 2, Maximum 16 Proben) gesammelt.

Darüber hinaus wurden Blutproben einer Kontrollgruppe von drei gesunden Probanden gesammelt.

Die genomische DNA wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit aus dem leukozytenangereicherten Vollblut präpariert. Mittels LightCycler®-PCR wurde die so gewonnene DNA zunächst auf Amplifizierbarkeit überprüft und quantifiziert. Die Untersuchung auf Mutationen im Kodon 12 des K-ras-Gens erfolgte mittels quantitativer PCR mit mutationsspezifischen Hybridisierungssonden und wildtypspezifischen PNAs mit anschließender Schmelzpunktanalyse. Durch Vergleich der Schmelztemperaturen der klinischen Proben mit den Werten der eingesetzten sequenzbekannten DNA-Standards konnten die Proben genotypisiert werden. Abbildung 4.9 illustriert die Mutationsanalyse exemplarisch anhand einiger Beispiele. Jede Probe wurde auf diese Weise mindestens zwei Mal auf Mutationen untersucht (Doppelwertbestimmung).

Der weitaus größte Teil aller gesammelten Patientenproben (237 bzw. 92,2 %) zeigte den K-ras-Wildtyp, bei 20 Proben (7,8%) wurde eine Mutation nachgewiesen (siehe Tabelle 4.5). In einer akuten Krankheitsphase war erwartungsgemäß der Anteil Proben mit Mutationsnachweis höher als in Intervallen mit kompletter Remission (12 von 48 Proben bzw. 25,0 % versus 8 von 209 Proben bzw. 3,8 %). Als insgesamt häufigste Mutation (14 Proben, 70 %) wurde in Kodon 12 die Basensequenz GTT (Valin) identifiziert. Bei den übrigen sechs Proben gelang auch unter Verwendung des Aspartat- und des Cystein-Sensors keine genaue Charakterisierung der Mutation.

In den Proben der gesunden Kontrollgruppe wurde ausschließlich der Wildtyp des K-ras-Gens nachgewiesen.

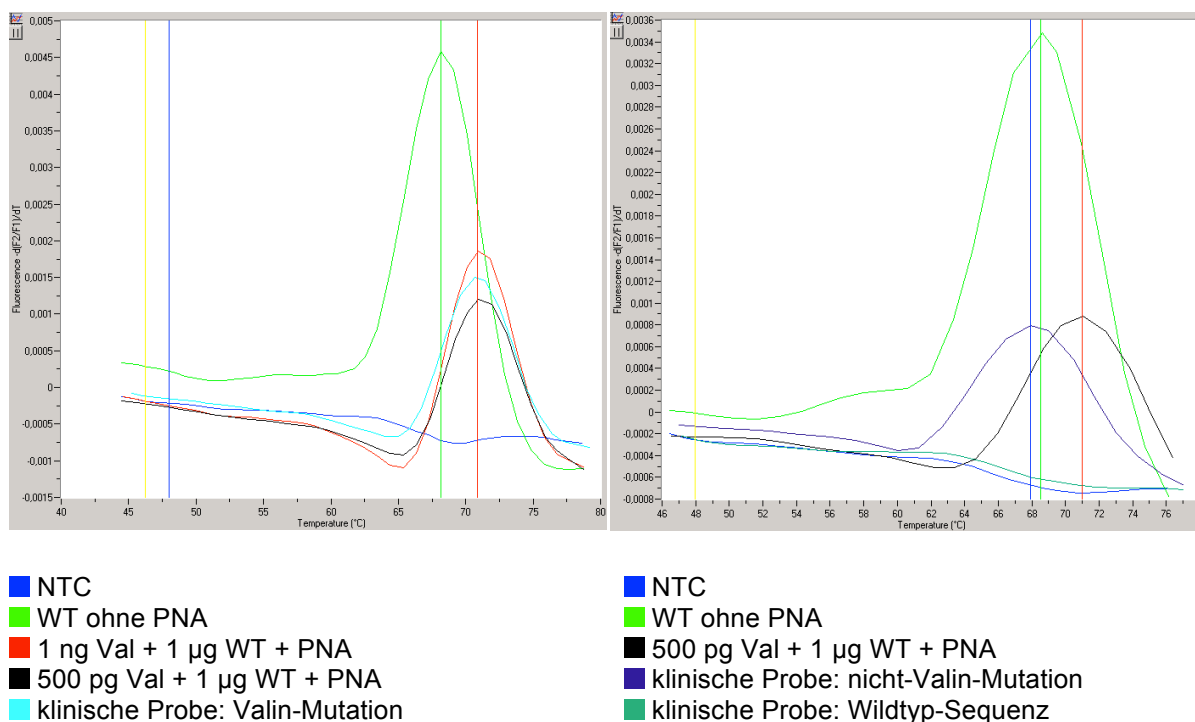


Abbildung 4.9: Genotypisierung der klinischen Proben mittels Schmelzpunktanalyse der K-ras-PCR-Produkte. In Gegenwart der Valin-Sonde zeigen sich für die Wildtyp-DNA und die Standardproben mit der Valin-Mutation die charakteristischen Schmelztemperaturen (durch senkrechte grüne bzw. rote Linie markiert). Die Fluoreszenzsondenbindung an die K-ras-Wildtyp-Allele wurde in den klinischen Proben durch PNAs supprimiert. Durch übereinstimmenden Schmelzpunkt kann die klinische Probe im linken Bild als Valin-Mutante identifiziert werden. Der Schmelzpunkt der violett dargestellten Patientenprobe im rechten Bildteil (blaue senkrechte Linie) liegt deutlich niedriger als bei der Valin-Probe. Da PNA eingesetzt wurde, handelt es sich also um eine andere als die Valin-Mutation. Die Schmelzkurve der anderen klinischen Probe im rechten Abbildungsteil (türkis) zeigt einen Verlauf analog der Negativkontrolle (NTC) und kann daher – bei zuvor nachgewiesener Amplifizierbarkeit des Gesamt-K-ras-Gens ohne PNA (hier nicht gezeigt) – als Wildtyp identifiziert werden.

Tabelle 4.5: Häufigkeiten des Wildtyp- bzw. Mutantennachweises in den verschiedenen Krankheitsintervallen.

	<i>AML-Ersterkrankung</i>		<i>AML-Rezidiv</i>		Σ
	<i>vor CR*</i>	<i>in CR*</i>	<i>vor CR*</i>	<i>in CR*</i>	
<i>K-ras-Wildtyp</i>	31	185	5	16	237
<i>K-ras-Mutation</i>	12	8	0	0	20
Σ	43	193	5	16	257

*komplette Remission

Durch den teilweise sehr niedrigen Gehalt an Gesamt-DNA bei Proben, die in Aplasiaphasen gewonnen wurden und die in mehreren Fällen unzureichende Reproduzierbarkeit der Kopienzahl der mutierten Allele, insbesondere in den unteren Bereichen, sind quantitative Aussagen nur sehr eingeschränkt möglich. Die insoweit

vorsichtig zu interpretierenden Messwerte ergaben für die identifizierten Mutationen minimal 8 Kopien des mutierten Allels in $1,49 \times 10^6$ Kopien des Gesamt-K-ras-Genes (Sensitivität 6×10^{-6}). Aufgrund der genannten Einschränkungen wurden weitere quantitative Auswertungen der Daten nicht vorgenommen.

Bei der Probengewinnung zur Mutationsanalyse wurde den Patienten zeitgleich Blut zur Bestimmung der Leukozytenzahl abgenommen. Für 255 Proben (99,2 %) steht ein solcher Leukozytenwert zur Verfügung. Die Leukozytenzahlen in den akuten Krankheitsphasen waren für Proben mit bzw. ohne Mutationsnachweis im K-ras-Gen statistisch vergleichbar (Median 6,2 bzw. 5,9 Leukozyten / nl Blut, siehe auch Abbildung 4.10). Auch in Proben, die in chemotherapieinduzierter Aplasie gewonnen wurden, konnten bei teilweise sehr niedrigen Leukozytenzahlen (Minimum 0,15 Leukozyten / nl Blut) Mutationen im K-ras-Gen nachgewiesen werden.

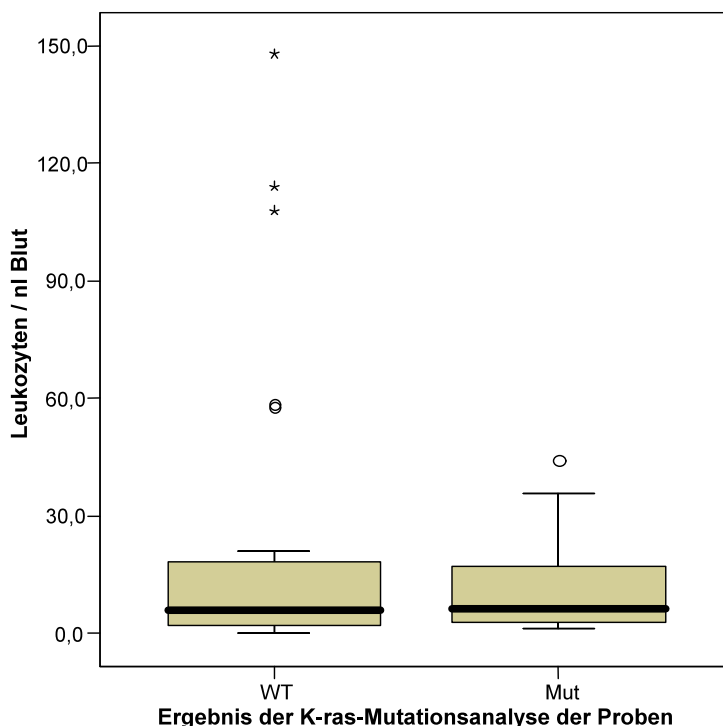


Abbildung 4.10: Vergleich der Leukozytenzahlen zwischen Proben mit und ohne K-ras-Mutation. Berücksichtigt sind die Proben aus AML-Ersterkrankung und Rezidiv, die vor Erreichen der Aplasie durch die Chemotherapie gewonnen wurden. Die simultan zur Probenabnahme für die Mutationsanalyse bestimmten Leukozytenwerte sind für Proben mit K-ras-Wildtyp (WT, n=36) links, für Proben mit Mutationsnachweis (Mut, n=12) rechts dargestellt. Der durchgeführte Mann-Whitney-U-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,924$).

Veränderungen im K-ras-Gen wurden bei neun Patienten (29,0 %) nachgewiesen. Bei sechs dieser Patienten (66,7 %) wurde konstant ein Einzelbasenaustausch von

der Wildtyp-Sequenz GGT (Glycin) zu GTT (Valin) festgestellt. Bei zwei Patienten (22,2 %) wurde gleichbleibend eine andere Mutation im K-ras-Gen nachgewiesen, deren Basensequenz auch mit Hilfe der Aspartat- und der Cystein-Sonde nicht eindeutig bestimmbar war. Ein Wechsel der Basensequenz bei den Proben mit nachgewiesener K-ras-Alteration wurde bei einem Patienten beobachtet: Hier war vor der Chemotherapie eine mit den Valin-, Cystein- und Asparat-Hybridisierungssonden nicht eindeutig zu differenzierende Veränderung von der Wildtyp-Sequenz GGT vorhanden, im Verlauf zeigten sich jedoch in kompletter Remission nach der Chemotherapie mehrfach Proben mit der Valin-Sequenz GTT. Bei den restlichen 22 Patienten (71,0 %) wurden keine Mutationen festgestellt. Eine Übersicht über den K-ras-Mutationsstatus aller in die Studie eingeschlossenen Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung findet sich in Abbildung 4.11.

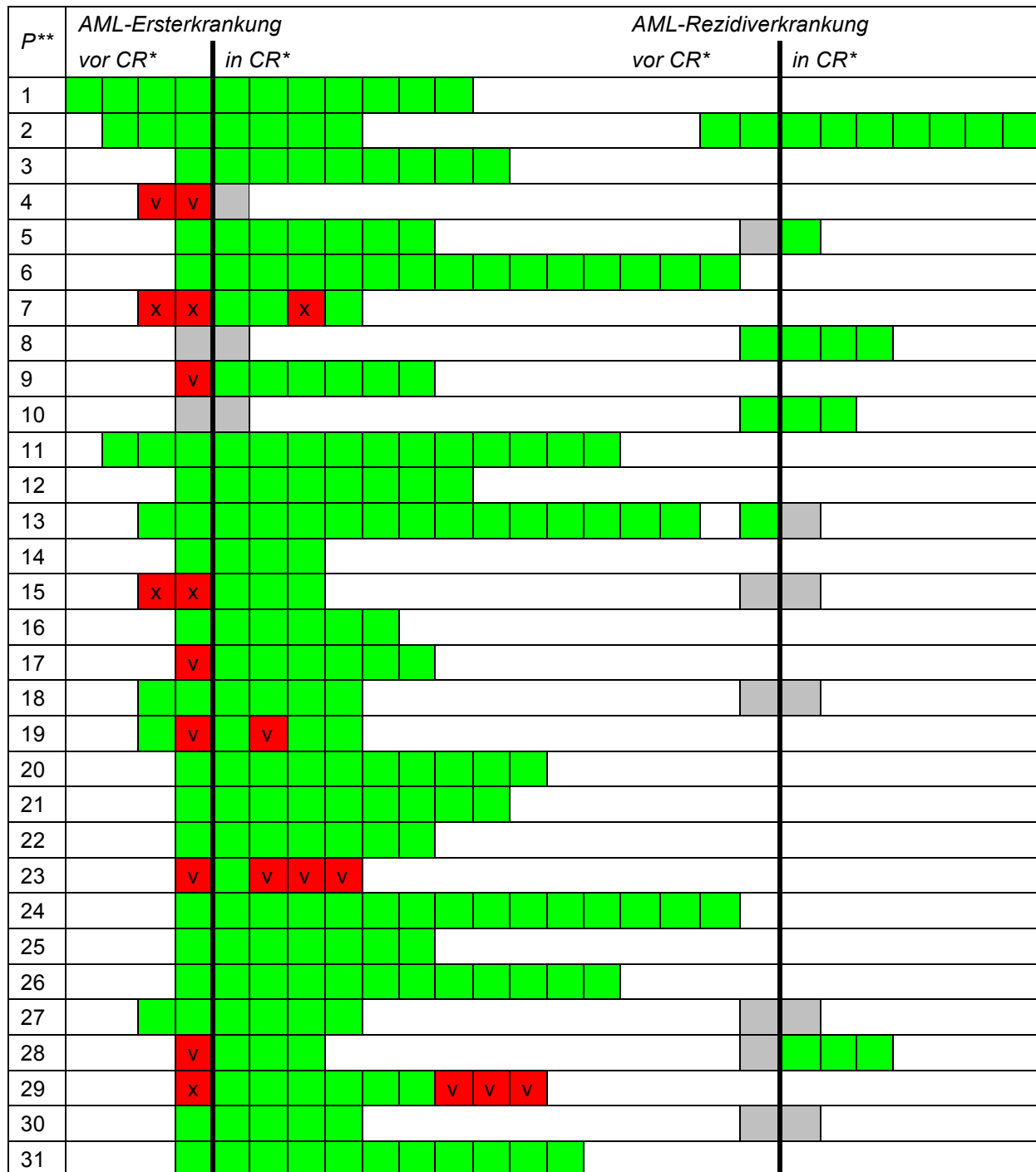


Abbildung 4.11: Verlauf des K-ras-Mutationsstatus der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Ergebnisse der K-ras-Mutationsanalysen der einzelnen Patienten als Horizontalbalken. Der linke Balken stellt hierbei die AML-Ersterkrankung, der rechte Balken ein ggf. vorhandenes Krankheitsrezidiv dar. Jede Probe ist als ein rechteckiges Element im Balken dargestellt (grün: K-ras-Wildtyp, rot: Mutation, grau: im jeweiligen Intervall keine Probe verfügbar), die Elemente links der dicken vertikalen Linie stellen Proben vor Erreichen einer kompletten Krankheitsremission dar, die Elemente rechts dieser Linie entsprechen Proben, die in kompletter klinischer Remission gewonnen wurden. Bei Mutationsnachweis ist die Basensequenz in Kodon 12 angegeben (v: GTT [Valin], x: Mutation mit anderer Basensequenz als GTT, TGT oder GAT).

*CR: komplette Remission. **P: Patientnummer.

4.2.3 Statistische Auswertung zur klinischen Relevanz des K-ras-Mutationsnachweises

Die klinische Bedeutung der K-ras-Mutation für die Pathogenese und den Verlauf der akuten myeloischen Leukämie ist bislang nicht hinreichend geklärt. Anhand des untersuchten Patientenkollektivs wurde mittels statistischer Methoden der Zusammenhang zwischen dem Nachweis einer Mutation in K-ras-Kodon 12 und verschiedenen klinischen Merkmalen überprüft.

Die Patienten mit K-ras-Mutationen sind bei AML-Erstdiagnose im Median über 10 Jahre älter als solche ohne Mutationsnachweis. Bei den sechs jüngsten Patienten der Studie wurde der K-ras-Wildtyp nachgewiesen, der älteste Patient ist Träger der Valin-Mutation GTT in Kodon 12 (vgl. Tabelle 4.4 und Abbildung 4.11). Statistisch war der Altersunterschied jedoch nicht signifikant ($p=0,086$). Am häufigsten wurden K-ras-Mutationen bei FAB-Subtyp M4 gesehen. Eine Assoziation kann jedoch anhand der vorliegenden Daten statistisch nicht nachgewiesen werden. Die K-ras-Mutationen traten nicht gehäuft bei bestimmten zytogenetischen Befunden auf. Ebenso ist statistisch kein Zusammenhang zu sekundären AML-Formen nachweisbar. Patienten mit K-ras-Wildtyp bzw. –Mutation unterscheiden sich nicht signifikant in Leukozytenzahlen oder Blastenanteil in Blut und Knochenmark. Bei keinem der Patienten mit K-ras-Mutation war zum Erreichen der kompletten Remission ein zweiter Chemotherapiezyklus erforderlich. Ein statistischer Nachweis von K-ras-Mutationen als positiver Faktor für das Therapieansprechen ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich. Die Rezidivrate ist für beide Gruppen vergleichbar, und die Rezidive treten nach ähnlichen Intervallen auf. Ebenso besteht kein Unterschied in der Häufigkeit der Todesfälle. Die Ergebnisse der statistischen Auswertungen sind in Tabelle 4.6 und Abbildung 4.12 dargestellt.

Tabelle 4.6: Gegenüberstellung der AML-Patienten mit K-ras-Wildtyp und K-ras-Mutationsnachweis.

	<i>K-ras Wildtyp</i> (22 Patienten)	<i>K-ras Mutation</i> (9 Patienten)	<i>p</i>
<i>Alter in Jahren</i> (Median \pm SEM ¹)	46,4 \pm 2,7	58,3 \pm 3,5	0,086*
<i>Geschlecht</i>	14 w / 8 m	4 w / 5 m	0,433**
<i>Sekundäre AML</i> ²	5 (22,7 %)	1 (11,1 %)	0,642**
<i>FAB-Subtyp</i>			0,516***
<i>M0</i>	1 (4,5 %)	1 (11,1 %)	
<i>M1</i>	3 (13,6 %)	2 (22,2 %)	
<i>M2</i>	8 (36,4 %)	2 (22,2 %)	
<i>M3</i>	0	0	
<i>M4</i>	2 (9,1 %)	3 (33,3 %)	
<i>M5</i>	4 (18,2 %)	1 (11,1 %)	
<i>M6</i>	2 (9,1 %)	0	
<i>M7</i>	0	0	
<i>keine Angaben</i>	2 (9,1 %)	0	
<i>Zytologie</i>			1,000**
<i>normal</i>	12 (54,5 %)	4 (44,4 %)	
<i>Aberrationen</i>	7 (31,8 %)	3 (33,3 %)	
<i>keine Angaben</i>	3 (13,6 %)	2 (22,2 %)	
<i>Leukozyten / nl Blut</i> (Median \pm SEM ¹)			
<i>vor CR</i> ³	5,6 \pm 6,0	6,4 \pm 3,8	0,668*
<i>nach CR</i> ³	0,5 \pm 0,3	0,6 \pm 0,5	0,124*
<i>Blasten / nl im peripheren Blut</i> ⁴ (Median \pm SEM ¹)	2,6 \pm 4,7	16,6 \pm 16,5	0,180*
<i>Blastenanteil im Knochenmark</i> ⁴ (Median \pm SEM ¹)	86,5 % \pm 8,6 %	55,0 % \pm 9,5 %	0,435*
<i>CR</i> ² nach 1. Zyklus der Induktionstherapie			0,324**
<i>ja</i>	16 (72,7 %)	6 (66,7 %)	
<i>nein</i>	4 (18,2 %)	0	
<i>keine Angabe</i>	2 (9,1 %)	3 (33,3 %)	
<i>Rezidiv</i> ⁴	7 (31,8 %)	2 (22,2 %)	0,862****
<i>rezidivfreie Zeit in Wochen</i> (Median \pm SEM ¹)	30 \pm 7	20 \pm 9	0,551*****
<i>Todesfälle</i> ⁴	3 (13,6 %)	1 (11,1 %)	0,895*****

*U-Test. **Exakter Test nach Fisher. ***Exakter Test nach Monte-Carlo. ****Vergleich der Überlebensfunktionen nach dem Logrank-Test. ***** t-Test.

¹Standardfehler des Mittelwertes. ²anamnestischer Hinweis auf sekundäre Genese der AML.

³komplette Remission. ⁴innerhalb des Beobachtungszeitraums.

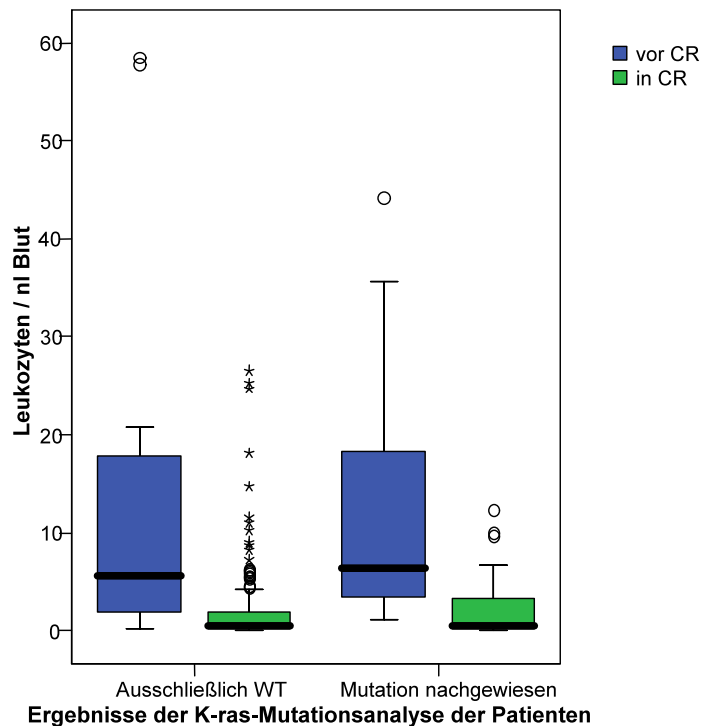


Abbildung 4.12: Gegenüberstellung der Leukozytenzahlen von Patienten mit und ohne nachgewiesener K-ras-Mutation in unterschiedlichen Krankheitsphasen. Dargestellt sind die gleichzeitig mit der Probenentnahme für die Mutationsanalyse gemessenen Leukozytenwerte der Patienten. Die linken Boxplots stellen die Leukozytenwerte der Patienten ohne nachgewiesene K-ras-Mutation dar, rechts sind die Leukozytenwerte der Patienten mit K-ras-Mutation dargestellt. Die blauen Boxplots entsprechen vor, die grünen Boxplots nach Erreichen einer kompletten Remission der Erst- bzw. Rezidivkrankung entnommenen Proben (n=35 bzw. n=165 für Patienten mit ausschließlich K-ras-Wildtyp-Nachweis vor bzw. nach CR, n=13 bzw. n=42 für Patienten mit Mutationsnachweis vor bzw. nach CR). Drei statistisch weit außerhalb liegende Leukozytenwerte (siehe Abbildung 4.10), die sämtlich dem linken blauen Boxplot zugeordnet werden, sind in der Grafik nicht mit abgebildet, um einen übersichtlichen Maßstab einhalten zu können.

5 Diskussion

5.1 Methodik der K-ras-Mutationsanalyse

Punktmutationen in den Ras-Genen gehören zu den häufigsten Veränderungen bei akuter myeloischer Leukämie [16]. N-ras- und K-ras-Mutationen sind dabei häufiger als Veränderungen im H-ras-Gen. K-ras-Mutationen betreffen bei der AML meistens Kodon 12 [20]. Die Assoziation von Ras-Mutationen zu bestimmten AML-Subtypen und ihre Rolle als prognostischer Marker konnten bisher nicht abschließend geklärt werden. Weiterhin ist unklar, inwieweit eine Verlaufskontrolle des Ras-Mutationsstatus während der Therapie und Nachsorge als Parameter für Therapieansprechen und komplette Krankheitsremission oder Erkrankungsrezidiv geeignet ist.

Zur Mutationsanalyse können neben der vollständigen Sequenzierung der Allele zahlreiche unterschiedliche Verfahren angewendet werden, die sich in Sensitivität und Arbeitsaufwand unterscheiden [75]: Eine Möglichkeit zum Nachweis von Mutationen ist der *Single strand conformation polymorphism assay* (SSCP). Dieser basiert auf dem unterschiedlichen Laufverhalten von DNA-Einzelsträngen in der Gel-Elektrophorese aufgrund einer veränderten Konformation, die sich aus einer Abweichung der Basensequenz ergibt [76]. Das Auftreten oder Fehlen von Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen in Allelen mit bzw. ohne Mutation kann ebenfalls zum Mutationsnachweis verwendet werden, da aus entsprechendem Restriktionsverdau DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe resultieren (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, RFLP) [77]. Teilweise wird ein Restriktionsverdau von Wildtyp-Allelen zwischen wiederholten Amplifikationsschritten zur Anreicherung der mutierten Allele eingesetzt [74;78]. Bekannte Mutationen können außerdem durch allelspezifische PCR-Amplifikation (ASA) mit Hilfe von mutationssensitiven Primern oder durch Hybridisierung mit allelspezifischen, markierten Oligonukleotiden (ASO) nachgewiesen werden [79;80].

Die starke Sequenzspezifität der PNA-Hybridisierung an DNA kann ebenfalls zur Mutationsanalyse ausgenutzt werden. PNA-Oligomere binden bei vollständiger Basenhomologie mit höherer Thermostabilität an DNA als DNA- oder RNA-Oligonukleotide. Hingegen ist die Bindung bei Einzelbasen-Fehlpaarung im Vergleich mit DNA-DNA- und DNA-RNA-Hybriden stärker destabilisiert. Darüber hinaus sind

PNA-Oligomere keine Substrate für DNA-Polymerasen und bilden daher keine Startmoleküle für die DNA-Strangsynthese in der PCR [73]. Thiede und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch K-ras-wildtypspezifische PNA-Bausteine die DNA-Primeranlagerung an eine partiell überlappende Sequenz wirksam verhindert wird, so dass eine Amplifikation des Wildtyp-Allels mittels PCR hierdurch unterbunden wird. Die PNA-Bindung an Allele mit Punktmutationen in der Bindungssequenz ist jedoch so stark destabilisiert, dass eine Primerbindung und somit eine selektive Amplifikation der mutierten Allele stattfinden konnte [81]. Nachteil dieses Verfahrens ist die Notwendigkeit der Sequenzierung im Anschluss an die PCR zur Charakterisierung der vorliegenden Mutationen. Sun und Mitarbeiter entwickelten eine automatisierbare Methode mit PNA-gesteuerter PCR und anschließender Sequenzierung zur Mutationsidentifikation [70].

In der vorliegenden Arbeit wurde das PNA-gestützte Verfahren modifiziert und mit einer quantitativen PCR mit mutationsspezifischen, fluoreszenzfarbstoffmarkierten Hybridisierungssonden kombiniert. Diese Sonden dienen dem hochsensitiven, quantitativen Nachweis der K-ras-Mutationen in den Proben. Durch den geringen Anteil unspezifischer Basenpaarungen der Sonden mit der Wildtyp-Sequenz kommt es jedoch ohne PNA auch zu Hybridisierung der Sonden mit normalen Allelen, so dass bei der PCR ohne PNA keine Unterscheidung von Wildtyp und Mutation möglich ist [82]. Die wildtypspezifischen PNA-Oligomere unterdrücken die Sondenbindung an die normale K-ras-Sequenz, wodurch mit den Hybridisierungssonden hochspezifisch die Amplifikation der mutierten Allele gemessen wird. Der quantitative Nachweis auch geringer Mengen eines Zielgens mit Hilfe von Fluoreszenzsonden wurde auch in anderen Zusammenhängen erfolgreich angewendet, beispielsweise zur Detektion von AML1-ETO-Genfusionen bei der AML [83].

Im Anschluss an die PCR fand eine Genotypisierung durch Schmelzanalyse der Sondenbindung an die amplifizierte DNA statt. Die mutationsspezifischen Sonden ermöglichen die Identifikation der jeweiligen Mutation anhand eines charakteristischen Schmelzprofils. Auch hier ist die Suppression der Fluoreszenzsondenbindung an die Wildtyp-Allele notwendig. Ohne PNA werden Mutationen nur detektiert, wenn ihr Kopienanteil mindestens 10 % beträgt [82]. Auch

bei dieser Arbeit konnten geringe Kopienzahlen von K-ras-Mutationen bei weitaus höherem Anteil an Wildtyp-Allelen ohne PNA nicht detektiert werden. Bei ausreichender PNA-Konzentration wurde selektiv die Schmelzkurve der mutierten Kopien aufgezeichnet.

Die beschriebene Methode eignet sich gut zum Nachweis von K-ras-Mutationen in peripheren Blutzellen. Darüber hinaus können auf analoge Weise auch K-ras-Mutationen im Plasma und Tumorgewebe von Patienten mit Pankreaskarzinomen detektiert werden [84;85]. Mit ähnlichen Ansätzen konnten durch kombinierte Anwendung von Hybridisierungssonden und PNA-Bausteinen bereits c-Kit-Mutationen bei Patienten mit Urticaria pigmentosa sowie K-ras-Mutationen im Gallengangsaspirat von Patienten mit Pankreas- und Cholangiokarzinomen nachgewiesen werden [86;87].

Ein großer Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Verfahren ist der schnelle Reaktionsablauf. Die Zeit für Amplifikation und Genotypisierung liegt bei nur etwa einer Stunde. Aufwendige Arbeitsschritte wie Sequenzierung, Restriktionsverdau, Gel-Elektrophorese oder Farbreaktionen, wie sie beispielsweise bei RFLP-basierten Methoden, SSCP-Assays oder differenzieller Oligonukleotidhybridisierung nötig sind, werden hier vermieden. Darüber hinaus findet der gesamte Analysevorgang automatisiert in einem geschlossenen Gefäß statt, wodurch das Risiko falsch-positiver Messwerte durch Probenverunreinigungen minimiert wird.

Bei ASA durch mutationssensitive Primer und Methoden, bei der PNA-Oligomere die Primerbindung an die Wildtyp-Sequenz unterdrücken, besteht generell ein erhöhtes Risiko von falsch-positiven Ergebnissen. In der Praxis kann hierbei eine Anlagerung der mutationsspezifischen Primer an einen Wildtyp-Strang nicht komplett ausgeschlossen werden. Derart entstandene PCR-Produkte lassen sich nicht von regelrechten Amplifikaten einer mutierten Sequenz unterscheiden. Im Gegensatz dazu wirkt sich eine unerwünschte Hybridisierung der mutationsspezifischen Sensorsonde an einen DNA-Strang mit Wildtyp-Sequenz nur einmalig bei der nachfolgenden Fluoreszenzmessung aus und hat keinen Einfluss auf den weiteren Verlauf der Analyse.

RFLP-basierte Methoden beruhen auf der Existenz einer exakten Basensequenz zur Unterscheidung von Wildtyp-Allel und Mutante. Hierbei ergibt sich ein Risiko aus der Fehleranfälligkeit der DNA-Polymerase, die zu falschen Ergebnissen führen kann.

Des Weiteren erkennen Restriktionsenzyme ausschließlich definierte Sequenzen, wodurch der Anwendungsrahmen begrenzt ist. Dabei können Mutationen, die zu verschiedenen Basenfolgen führen, übersehen werden. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode können auch Mutationen innerhalb der Bindungssequenz der Sonden detektiert werden, für die keine spezifischen Sonden konstruiert wurden. In diesen Fällen kommt es durch die unvollständige Basenhomologie zwischen Hybridisierungssonde und Ziel-DNA zu Affinitätsveränderungen, die sich in einer Verringerung der Schmelztemperatur bemerkbar machen. Somit sind gegebenenfalls mehrere Mutationen mit der gleichen Sonde detektierbar und können voneinander unterschieden werden. Diese Technik konnte bereits erfolgreich bei der Genotypisierung von Hepatitis-C- und Herpesviren eingesetzt werden [88-90]. Chen et al. gelang auf diese Weise die Identifikation von mindestens vier unterschiedlichen K-ras-Mutationen mit einem Sondenpaar [87]. Die von Sotlar et al. hergestellte Sensorsonde zur Detektion von c-kit-Mutationen kann mindestens fünf verschiedene Varianten unterscheiden [86]. Auch mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungssonden ist eine Detektion nicht nur jeweils einer spezifischen, sondern auch weiterer Mutationen möglich. So konnten in insgesamt 6 klinischen Proben Mutationen gefunden werden, für die keine spezifische Sonde verfügbar war.

Restriktionsenzym-basierte Methoden zur Detektion von Mutationen erreichen Sensitivitäten im Bereich von 1×10^{-3} [74;91]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PNA- und fluoreszenzsondenbasierte Methode mit dem Enriched RFLP/PCR-Verfahren von Mora et al. verglichen [74]. Die von Mora und Kollegen verwendete, deutlich aufwendigere Methode mit restriktionsenzymatischem Verdau bestätigt Sensitivitäten in der genannten Größenordnung. PCR-Methoden, bei denen die Primerbindung durch PNA-Oligomere gesteuert wird, erzielen beim Mutationsnachweis Sensitivitäten zwischen 5×10^{-3} und 1×10^{-4} [70;81].

Die Sensitivität der im vorliegenden Manuskript beschriebenen PNA- und fluoreszenzsondengekoppelten Methode zum Nachweis von K-ras-Mutationen im peripheren Blut erreicht eine Sensitivität von bis zu 1×10^{-5} bei Verwendung der Valin-Sonde. Der methodenabhängige Sensitivitätsvorteil zur RFLP-basierten Mutationsanalyse konnte somit eindeutig gezeigt werden.

In den methodisch eng verwandten Arbeiten von Sotlar und Chen und Mitarbeitern wurden Sensitivitäten von maximal 1×10^{-3} bzw. 3×10^{-4} erreicht [86;87]. Die

Ursachen der so stark differierenden Sensitivitäten der prinzipiell ähnlichen Verfahren könnten unter anderem im Design der PNA-Oligomere und der Sonden liegen. Sotlar et al. erreichten bei ihren Analysen die geringste Sensitivität. Sie verwendeten ein PNA 19-mer, bei dem eine Einzelbasen-Fehlpaarung thermodynamisch eine geringere Rolle spielt als bei einem 17-mer, wie es bei den Experimenten von Chen und Kollegen und in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Der geringere Guanin- und Cytosinegehalt des von Sotlar et al. verwendeten PNA-Bausteins könnte durch geringere Bindungsstärke die Sensitivität ebenfalls negativ beeinflusst haben. Auch die PNA-Konzentration im Reaktionsansatz im Verhältnis zur DNA-Menge ist für die Sensitivität bedeutend: Einerseits muss genügend PNA zur vollständigen Unterdrückung der Sondenbindung an die Wildtyp-Allele vorhanden sein, andererseits beeinträchtigen zu hohe PNA-Konzentrationen den Reaktionsablauf und führen mit zunehmender Menge vermehrt zu unspezifischen Bindungen an mutierte Allele, so dass die Sensitivität der Methode reduziert wird. In den Optimierungsexperimenten der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass eine PNA-Konzentration von 2,5 μM (50 pmol / 20 μl) in einem Ansatz mit 1 μg Wildtyp-DNA zu einer optimalen Unterdrückung der Fluoreszenzsondenbindung an die Wildtyp-Sequenz führt und eine selektive Messung der mutierten Allele ermöglicht. In der Arbeit von Sotlar et al. wurden die PNA-Oligomere in einer Konzentration von 0,75 μM in Ansätzen mit 1 μg Wildtyp-DNA eingesetzt [86]. Chen et al. wählten eine PNA-Konzentration von 1,5 μM in Anwesenheit von 50 ng Wildtyp-DNA [87]. Die Unterschiede in den verwendeten Verhältnissen von PNA-Konzentration zu DNA-Menge könnten in den verschiedenen Arten der untersuchten Proben und den jeweils untersuchten Zielgenen begründet liegen.

Wie entscheidend die Hybridisierungssonden für die Empfindlichkeit des Mutationsnachweises sind, zeigt sich in den Sensitivitätsunterschieden, die durch Austausch der mutationsspezifischen Sonde auftreten. In dieser Arbeit unterschieden sich Sensitivitäten des Assays unter Verwendung der drei verschiedenen Sonden um einen Faktor von bis zu 15 (ermittelte Sensitivität bei Verwendung des Valin-Sensors: 1×10^{-5} ; Sensitivität bei Einsatz der Cystein-Sonde: $1,5 \times 10^{-4}$). Auch Chen und Mitarbeiter beschreiben deutliche Sensitivitätsunterschiede des Mutationsnachweises in Abhängigkeit von der verwendeten Hybridisierungssonde [87].

Darüber hinaus können Unterschiede im Probenmaterial eine Rolle für die Sensitivität spielen. In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen aus dem

peripheren venösen Blut untersucht. Sotlar et al. untersuchten in ihrer Arbeit paraffinfixiertes Gewebe, das bis zu 24 Jahre alt war [86]. In der Arbeit von Chen et al. wurde Gallenflüssigkeit untersucht [87]. In der Galle enthaltene Substanzen wie Bilirubin können eine PCR inhibieren und die Sensitivität der Nachweismethode somit negativ beeinflussen [92;93].

Die hier beschriebene quantitative PNA-gekoppelte PCR mit Hybridisierungssonden stellt zusammenfassend eine hochsensitive und spezifische Methode zum Nachweis von K-ras-Mutationen im peripheren Blut dar. Darüber hinaus findet der gesamte Analysevorgang schnell und automatisiert statt und beinhaltet im Vergleich zu anderen Methoden weniger aufwendige Arbeitsschritte, wodurch das Risiko falsch-positiver Ergebnisse durch Probenverunreinigungen reduziert wird. Die Methode ist daher potentiell für eine breite Anwendung an klinischen Proben geeignet.

5.2 Nachweis von K-ras-Mutationen bei AML-Patienten

Die Patienten wurden bei Erstdiagnose der AML bzw. bei Diagnose des Krankheitsrezidivs auf Vorliegen einer K-ras-Mutation im leukozytenangereicherten Vollblut untersucht. Unter Therapie und im weiteren Verlauf erfolgten weitere Bestimmungen des K-ras-Mutationsstatus.

Parallel zur Probenabnahme für die Mutationsanalyse wurden die Leukozytenzahlen im peripheren Blut der Patienten bestimmt. Hier war statistisch kein Unterschied zwischen Proben mit und ohne K-ras-Mutationsnachweis zu erkennen. K-ras-Mutationen wurden sowohl zu Zeitpunkten mit hohen Leukozytenzahlen und großen Blastenanteilen im peripheren Blut als auch bei therapieassoziierten Knochenmarkaplasien nachgewiesen. Dies spricht für eine hohe Zuverlässigkeit der Analyseverfahren auch bei geringen Leukozytenzahlen und geringen Gesamt-DNA-Mengen.

Die angewandte Untersuchungsmethode erfasst mit hoher Sensitivität Punktmutationen im Kodon 12 von K-ras, das bei AML-assoziierten Veränderungen des Gens am häufigsten betroffen ist. Die Wildtyp-Form des K-ras-Kodons 12 kodiert mit der Sequenz GGT für die Aminosäure Glycin.

Mutationen in diesem Kodon konnten bei 9 von 31 Patienten (29,0 %) nachgewiesen werden. Bei gesunden Probanden wurden erwartungsgemäß keine K-ras-Mutationen

gefunden. Alle Untersuchungen wurden mindestens als Doppelwertmessungen durchgeführt.

Andere Autoren geben für K-ras-Mutationen bei AML geringere Frequenzen zwischen 3,5 % und 13,3 % an [28;29;32;34;38;40;67-69;94;95]. In diesen Arbeiten wurden jedoch andere Analysemethoden verwendet, unter anderem ASA, RFLP, SSCP oder Hybridisierung mit Oligonukleotiden, die deutlich geringere Sensitivitäten aufweisen. Ras-Mutationen treten bei der AML zum Teil nur in einer Subpopulation der leukämischen Zellen auf [21;22;31]. Dies entspricht auch dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, da bei einigen Proben die Kopienzahl des mutierten Allels gemessen an der Gesamtzahl der K-ras-Kopien sehr gering war. Solche Proben werden durch Analyseverfahren mit geringer Sensitivität als fälschlicherweise als Wildtyp gewertet. Unterschiedliche Zeitpunkte der Probengewinnung können die Nachweisbarkeit von K-ras-Mutationen ebenfalls beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurden von jedem Patienten mehrere Blutproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen. Teilweise kam es erst im Verlauf zu einem Nachweis einer K-ras-Mutation. Alterationen, die erst bei Progression der Leukämie auftreten, werden in Studien mit nur einmaliger Probenabnahme gegebenenfalls nicht erfasst. Auch weitere methodische Unterschiede wie das Probenmaterial, die Probengewinnung oder die Technik der DNA-Isolation können eine Rolle spielen. Des Weiteren unterscheiden sich die demographischen und klinischen Daten der Studienpopulationen zwischen den einzelnen publizierten Untersuchungen zum Teil deutlich. Die Probanden wurden meist aus anderen Studien rekrutiert, wodurch in vielen Arbeiten überwiegend oder ausschließlich bestimmte Patientensubgruppen hinsichtlich des K-ras-Mutationsstatus untersucht wurden, beispielsweise bestimmte Altersgruppen oder Patienten mit bestimmten zytogenetischen Merkmalen [28;29;32;34;40;68;94]. Auch sind die Studiengruppen in vielen Untersuchungen – einschließlich der vorliegenden – relativ klein, so dass sich hierdurch statistische Verzerrungen ergeben können.

Die häufigste (70 % der mutationspositiven Proben, 78 % der mutationspositiven Patienten) im Rahmen dieser Arbeit detektierte Mutation der K-ras-Kodons 12 mit der Sequenz GTT führt zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Valin. Auch in der Literatur werden Valin-Mutationen neben Aspartat-, Cystein-, und Alanin-Mutationen zu den häufigsten Veränderungen des K-ras-Kodons 12 bei AML gezählt [20;29;32;34;67;68;94]. Eine komplette Krankheitsremission führte in allen Fällen

dazu, dass keine K-ras-Mutationen mehr detektiert wurden. Durch Chemotherapie wurde der maligne, mutationspositive Zellklon eliminiert oder zumindest unter die Nachweisgrenze des Analyseverfahrens reduziert. Besonders in Zweifelsfällen könnte eine erneute Untersuchung des K-ras-Mutationsstatus nach der Induktionstherapie einen Beitrag zur Bewertung des Therapieerfolges leisten.

Bei vier der neun Patienten mit initialem Mutationsnachweis wurde zu späteren Zeitpunkten wieder eine K-ras-Mutation detektiert, obwohl die betreffenden Patienten klinisch weiterhin in kompletter Remission waren. Teilweise war der Mutationsnachweis im Verlauf inkonstant, hier könnte die Sensitivitätsgrenze des Nachweisverfahrens eine Rolle spielen. Die Detektion von K-ras-Alterationen im peripheren Blut in kompletter klinischer Remission kann als Hinweis gewertet werden, dass der maligne Stammzellklon durch die Therapie nicht vollständig eliminiert werden konnte. Alternativ könnte sich die K-ras-Mutation sekundär entwickelt haben - beispielsweise durch Schädigung des gesunden Knochenmarkanteils durch die Chemotherapie der AML. Bei einem der Patienten dieser Studie wurden vor und nach Chemotherapie unterschiedliche Mutationen des K-ras-Gens gefunden. Hier wird es sich wahrscheinlich nicht um eine erneute Proliferation eines unvollständig eliminierten malignen Zellklons handeln. Eher scheinen sich die beiden K-ras-Mutationen getrennt von einander entwickelt zu haben. Der erstmalige Nachweis oder das Wiederauftreten einer K-ras-Alteration nach kompletter Remission einer AML könnten ein Anhaltspunkt für eine erneute Vermehrung entarteter Stammzellen im Knochenmark sein. Dies könnte somit als Hinweis auf ein Rezidiv der Erkrankung dienen. Bei keinem der vier Patienten mit Wiederauftreten einer K-ras-Mutation in Krankheitsremission kam es während des Beobachtungszeitraumes zu einem Rezidiv der AML. Das spricht für die weit verbreitete These, dass einzelne Mutationen allein für die Entartung von Zellen nicht hinreichend sind, sondern erst das Zusammenwirken verschiedener Alterationen zum Ausbruch einer malignen Erkrankung führt [15]. Über das konkrete Rezidivrisiko durch erneuten Nachweis einer K-ras-Mutation in kompletter Remission kann auf der Basis dieser Studie keine Aussage gemacht werden. Trotz der Rezidivfreiheit der betreffenden Patienten dieser Studie erscheint es grundsätzlich sinnvoll, Patienten, bei denen eine K-ras-Mutation erneut auftritt, besonders engmaschig hinsichtlich einer erneuten bösartigen Erkrankung zu untersuchen. Zur genauen Bewertung des

Risikos und zur Entwicklung geeigneter Nachsorgestrategien in diesen Fällen ist eine größere Studie mit mehr Patienten und längeren Beobachtungszeiträumen nötig.

K-ras-Mutationen wurden im Rahmen dieser Studie tendenziell häufiger bei älteren als bei jüngeren Patienten nachgewiesen. Die verfügbaren Studien in der Literatur trennen nicht zwischen den verschiedenen Ras-Mutationen oder untersuchen ausschließlich N-ras. Hierbei werden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Alter und Nachweis einer Ras-Mutation bei AML angegeben [27-29;32;38;67;69;95]. Teilweise waren die Patienten mit Ras-Mutationsnachweis in anderen Studien tendenziell ebenfalls älter als solche mit Ras-Wildtyp; die Daten von Barletta und Mitarbeitern verfehlen hier nur knapp das Signifikanzniveau [67].

Eine signifikante Häufung der K-ras-Veränderungen bei einem Geschlecht zeigte sich in dieser Studie nicht; Männer waren jedoch tendenziell häufiger Mutationsträger als Frauen. Barletta et al. beschreiben anhand ihrer Studiendaten ebenfalls eine etwas höhere Ras-Mutationsrate bei männlichen AML-Patienten; unter den Personen mit Veränderungen in K-ras-Kodon 12 sind vier von fünf Patienten männlich [67].

Die meisten Studien zeigen keine signifikante Häufung von Ras-Mutationen bei *de novo*- oder sekundären Leukämien [28;32;38]. Eine Studie lässt jedoch einen Zusammenhang zwischen berufsbedingter Exposition gegenüber chemischen Substanzen und Ras-Mutationen bei AML vermuten [67]. Ein berufsbedingter Umgang mit solchen schädigenden Stoffen ist bei keinem der Patienten der vorliegenden Arbeit bekannt. Für K-ras-Mutationen konnte in dieser Untersuchung statistisch keine Assoziation zu *de novo*-AML oder sekundärer Erkrankung gezeigt werden.

Eine Assoziation von Ras-Mutationen mit bestimmten zytogenetischen Konstellationen geht aus der Mehrheit der publizierten Arbeiten nicht hervor [28;29;34;38;95]. Bowen et al. beschreiben eine Assoziation von K-ras-Mutationen mit einer Inversion des Chromosoms 16 [32]. In der vorliegenden Studie tritt eine *inv(16)* lediglich bei einem Patienten auf, bei diesem konnte auch eine K-ras-Mutation nachgewiesen werden. Bei der geringen Fallzahl konnte kein statistischer Zusammenhang nachgewiesen werden. Der häufigste pathologische zytogenetische

Befund der Patienten mit K-ras-Mutation ist die Trisomie 8, die jedoch auch in der Gruppe der Patienten ohne Mutationsnachweis vorkommt und statistisch nicht mit dem Mutationsstatus assoziiert ist. Insgesamt ergibt sich anhand der Studiendaten bezüglich zytogenetischer Befunde kein Zusammenhang mit der Existenz oder der Abwesenheit einer K-ras-Mutation.

Andere Autoren beschreiben zum Teil eine relative Häufung von Ras-Mutationen beim FAB-Typ M4 [28;32;95]. Auch in dieser Arbeit wurde bei FAB-Subtyp M4 ein tendenziell höherer Anteil an K-ras-Mutationen beobachtet als bei anderen FAB-Subtypen.

Die Patienten mit K-ras-Mutation wiesen bei tendenziell geringerer Knochenmarkinfiltration bei Diagnosestellung im Mittel höhere Blastenzahlen im peripheren Blut auf als Patienten mit dem K-ras-Wildtyp. Dies war jedoch bei der untersuchten Patientenzahl nicht signifikant. Möglicherweise führt eine Ras-Mutation zum früheren Ausschwemmen der Blasten aus dem Knochenmark ins Blut, so dass höhere periphere Blastenzahlen bereits bei geringer Infiltration des Knochenmarks die Folge sind. Höhere Blastenzahlen im Falle der K-ras-Mutation ließen sich auch durch die dauerhafte Aktivierung des Ras-Proteins erklären, die zu gesteigerter, unkontrollierter Proliferation und verminderter Apoptose der betroffenen Zellen führt [16;17]. Andere Studien, bei denen K-ras-Mutationen nicht gesondert untersucht wurden, zeigen bei Ras-Mutationen keine höheren Blastenzahlen im Blut, allerdings ist die Knochenmarkinfiltration hier teilweise geringer [28;29;34;38].

Die prognostische Relevanz von Ras-Mutationen bei der AML ist nicht geklärt: Einige Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass sich diese Mutationen günstig auf das Gesamtüberleben auswirken [33;34], andere Studien zeigen, dass Ras-Alterationen prognostisch ungünstig sind [35;41]. Weitere Arbeiten können keinen Einfluss von Ras-Mutationen auf die Prognose erkennen [28;29;31;32;38;69]. Die meisten der oben genannten Studien untersuchten jedoch ausschließlich N-ras-Mutationen oder unterschieden nicht zwischen den Mutationen in den verschiedenen Ras-Genen. Eine prognostische Relevanz der Mutation des K-ras-Kodons 12 konnte auch in dieser Arbeit statistisch nicht nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Remissionsrate war der Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Mutationsnachweis nicht signifikant. Jedoch wiesen alle Patienten, die nach dem ersten Zyklus der

Chemotherapie noch nicht in kompletter Remission waren, den K-ras-Wildtyp auf, somit besteht möglicherweise ein Hinweis auf eine positive Assoziation zwischen K-ras-Mutation und Therapieansprechen. Ähnliche nicht-signifikante Unterschiede werden auch von anderen Autoren berichtet, die teilweise zu Spekulationen über einen Zusammenhang zwischen Ras-Mutationen und Therapieerfolg führten [31;32;34]. Diese These wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass Patienten mit Nachweis von Ras-Mutationen bei der AML-Ersterkrankung teilweise Krankheitsrezidive ohne Ras-Mutationen hatten. Daher wurde angenommen, dass Zellklone mit mutiertem Ras-Gen empfänglicher für die Chemotherapie waren [34]. Hinsichtlich Rezidivrate, rezidivfreier Zeit und Gesamtüberleben zeigten sich bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von etwa einem Jahr in dieser Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne K-ras-Mutation.

5.3 Ausblick

Die quantitative PCR mit mutationsspezifischen Hybridisierungssonden und wildtypspezifischen PNAs zur Unterdrückung der Fluoreszenzsignale der Wildtyp-Allele ist ein hochsensitives und elegantes Verfahren zum Nachweis von K-ras-Mutationen. Neben dem Mutationsnachweis sind darüber hinaus quantitative Aussagen möglich.

Die Gene der Ras-Familie sind sowohl bei der AML als auch bei vielen anderen Tumorerkrankungen häufig von Mutationen betroffen. Die Notwendigkeit posttranslationaler Modifikationen an den Ras-Proteinen als Voraussetzung für deren biologische Aktivität bietet einen möglichen Angriffspunkt für die Therapie. Farnesyltransferaseinhibitoren werden derzeit im Rahmen von klinischen Studien eingesetzt, wobei der therapeutische Erfolg oftmals geringer ist als zunächst erhofft [42-44;46]. Dies kann teilweise mit alternativen Ras-Aktivierungsreaktionen durch andere Enzyme erklärt werden [16]. Außerdem sind Tumorerkrankungen das Resultat des Zusammenwirkens multipler genetischer Aberrationen. Möglicherweise reicht in vielen Fällen das Angreifen an einem Signalweg nicht aus, um einen therapeutischen Erfolg zu erzielen.

Die zum Krankheitsausbruch führenden genetischen Veränderungen in den neoplastischen Zellen unterscheiden sich bei der AML und anderen neoplastischen

Erkrankungen von Fall zu Fall. Ein zunehmend besseres Verständnis der zusammenwirkenden pathologischen Prozesse bietet die Möglichkeit für die Entwicklung zielgerichteter, potentiell nebenwirkungsarmer molekularer Therapien. Dabei sind sensitive, zuverlässige und effiziente diagnostische Methoden für den Nachweis der entsprechenden molekularen Marker beim Patienten wichtige Vorbedingungen für den Einsatz solcher Therapien. Hier könnten Methoden wie die in dieser Arbeit angewandte PNA-gestützte quantitative PCR einen wichtigen Beitrag leisten.

6 Zusammenfassung

Bei der akuten myeloischen Leukämie führt eine Akkumulation genetischer Veränderungen zur malignen Transformation der hämatopoetischen Stammzellen. Punktmutationen in den Ras-Protoonkogenen, insbesondere N-ras und K-ras, werden bei der AML in bis zu 44 % der Fälle nachgewiesen; die klinische Relevanz dieser Mutationen ist bislang nicht abschließend geklärt, insbesondere die Bedeutung der K-ras-Mutationen bei der AML bedarf weiterer Untersuchungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine quantitative PCR zum Nachweis von K-ras-Punktmutationen im häufig betroffenen Kodon 12 optimiert und evaluiert. Hierbei kamen mutationsspezifische, fluoreszenzfarbstoffmarkierte Hybridisierungs-sonden und wildtypspezifische PNAs zur Unterdrückung der Sondenbindung an K-ras-Wildtyp-Sequenzen zum Einsatz.

Diese Methode ermöglicht einen Mutationsnachweis mit einer Sensitivität von bis zu 1×10^{-5} und stellt damit das derzeit sensitivste Verfahren zum Nachweis von K-ras-Mutationen dar. Zusätzlich zur Genotypisierung werden quantitative Ergebnisse erzielt.

Mit Hilfe der optimierten Methode wurden insgesamt 257 Blutproben von 31 AML-Patienten im Sinne einer Longitudinalanalyse auf das Vorliegen einer K-ras-Mutation untersucht. Bei neun Patienten (29 %) konnte eine solche Genveränderung festgestellt werden. Dabei war die häufigste Mutation eine Veränderung der Kodon-12-Wildtyp-Sequenz GGT (Glycin) zu GTT (Valin), die bei insgesamt sieben der neun Patienten (78 %) gefunden wurde. Patienten mit K-ras-Mutationen waren tendenziell älter als Patienten ohne K-ras-Mutation und wiesen häufiger den FAB-Subtyp M4 auf. Statistisch ist ein Zusammenhang mit der K-ras-Mutation anhand des untersuchten Patientenkollektivs jedoch nicht nachweisbar. Ein Mutationsnachweis ist ebenso nicht signifikant mit dem Geschlecht, bestimmten zytologischen Befunden, der Blastenzahl im Blut respektive im Knochenmark oder der Prognose assoziiert. Beim Erreichen einer kompletten Krankheitsremission war die Mutation bei keinem der Patienten mehr nachweisbar. Vor allem bei grenzwertigen Befunden könnte die erneute Überprüfung des K-ras-Mutationsstatus nach erfolgter Induktionstherapie gegebenenfalls einen Beitrag zur Bewertung des Therapieerfolges leisten.

Die AML ist eine heterogene Erkrankung, bei der sich die krankheitsauslösenden genetischen Veränderungen in den neoplastischen Zellen von Fall zu Fall unterscheiden. Die Entwicklung zielgerichteter molekularer Therapien setzt neben dem Verständnis für die pathologischen Prozesse die Existenz diagnostischer Methoden voraus, mit Hilfe derer entsprechende Marker verlässlich detektiert und im Verlauf kontrolliert werden können. Diese Voraussetzungen werden durch die in dieser Arbeit vorgestellte Methode erfüllt.

Ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt bei AML-Patienten mit Ras-Mutationen ist die Farnesylierungsreaktion, deren Inhibition bereits in mehreren Studien untersucht wurde. Das Ziel zukünftiger Entwicklungen könnte eine auf den Einzelfall zugeschnittene Kombination molekularer Therapien sein, die das Potential für gute Therapieerfolge bei geringen Nebenwirkungen bietet.

7 Literaturverzeichnis

1. Virchow R: Die Leukämie; In: Virchow, R: Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin. Frankfurt, Meidinger, 1856 p 190.
2. Fuchs R: Akute myeloische Leukämie. Bremen, Uni-Med Science, 2002.
3. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341:1051-1062.
4. Heilmeyer B, Buske C, Spiekermann K, Bohlander S, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Braess J: Diagnostik, Klassifikation und Prognosefaktoren der akuten myeloischen Leukämie. *Medizinische Klinik* 2007;102:296-308.
5. Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, Vardiman JW, Davis EM, Blough RR, Golomb HM, Rowley JD: Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol* 1986;4:325-345.
6. Austin H, Delzell E, Cole P: Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *Am J Epidemiol* 1988;127:419-439.
7. Brandt L, Nilsson PG, Mitelman F: Non-industrial exposure to benzene as leukaemogenic risk factor. *Lancet* 1977;2:1074.
8. Ishimaru T, Otake M, Ischimaru M: Dose-response relationship of neutrons and gamma rays to leukemia incidence among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki by type of leukemia, 1950--1971. *Radiat Res* 1979;77:377-394.
9. Kaldor JM, Day NE, Band P, Choi NW, Clarke EA, Coleman MP, Hakama M, Koch M, Langmark F, Neal FE, .: Second malignancies following testicular cancer, ovarian cancer and Hodgkin's disease: an international collaborative study among cancer registries. *Int J Cancer* 1987;39:571-585.
10. Thirman MJ, Larson RA: Therapy-related myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996;10:293-320.
11. Blayney DW, Longo DL, Young RC, Greene MH, Hubbard SM, Postal MG, Duffey PL, DeVita VT, Jr.: Decreasing risk of leukemia with prolonged follow-up after chemotherapy and radiotherapy for Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1987;316:710-714.
12. Andrieu JM, Ifrah N, Payen C, Fermanian J, Coscas Y, Flandrin G: Increased risk of secondary acute nonlymphocytic leukemia after extended-field radiation therapy combined with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1990;8:1148-1154.

13. Smith RE: Risk for the development of treatment-related acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome among patients with breast cancer: review of the literature and the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *Clin Breast Cancer* 2003;4:273-279.
14. Gilliland DG: Hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 2001;8:189-191.
15. Haferlach T, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Schnittger S: Insight into the molecular pathogenesis of myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol* 2007;14:90-97.
16. Beaupre DM, Kurzrock R: RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. *J Clin Oncol* 1999;17:1071-1079.
17. Byrne JL, Marshall CJ: The molecular pathophysiology of myeloid leukaemias: Ras revisited. *Br J Haematol* 1998;100:256-264.
18. Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, Perucho M: Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 1991;93:125-131.
19. Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R: Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS exhibit different leukemogenic potentials in mice. *Cancer Res* 2007;67:7139-7146.
20. Bos JL: ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-4689.
21. Bashey A, Gill R, Levi S, Farr CJ, Clutterbuck R, Millar JL, Pragnell IB, Marshall CJ: Mutational activation of the N-ras oncogene assessed in primary clonogenic culture of acute myeloid leukemia (AML): implications for the role of N-ras mutation in AML pathogenesis. *Blood* 1992;79:981-989.
22. Shen WP, Aldrich TH, Venta-Perez G, Franza BR, Jr., Furth ME: Expression of normal and mutant ras proteins in human acute leukemia. *Oncogene* 1987;1:157-165.
23. Horiike S, Misawa S, Nakai H, Kaneko H, Yokota S, Taniwaki M, Yamane Y, Inazawa J, Abe T, Kashima K: N-ras mutation and karyotypic evolution are closely associated with leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 1994;8:1331-1336.
24. Liu E, Hjelle B, Morgan R, Hecht F, Bishop JM: Mutations of the Kirsten-ras proto-oncogene in human preleukaemia. *Nature* 1987;330:186-188.
25. Taylor JA, Sandler DP, Bloomfield CD, Shore DL, Ball ED, Neubauer A, McIntyre OR, Liu E: ras oncogene activation and occupational exposures in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1626-1632.
26. Shu XO, Perentesis JP, Wen W, Buckley JD, Boyle E, Ross JA, Robison LL: Parental exposure to medications and hydrocarbons and ras mutations in children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1230-1235.

27. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S: Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006;107:3847-3853.
28. Ritter M, Kim TD, Lisske P, Thiede C, Schaich M, Neubauer A: Prognostic significance of N-RAS and K-RAS mutations in 232 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89:1397-1399.
29. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, Radich JP: FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:3589-3595.
30. Goemans BF, Zwaan CM, Miller M, Zimmermann M, Harlow A, Meshinchi S, Loonen AH, Hahlen K, Reinhardt D, Creutzig U, Kaspers GJ, Heinrich MC: Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005;19:1536-1542.
31. Radich JP, Kopecky KJ, Willman CL, Weick J, Head D, Appelbaum F, Collins SJ: N-ras mutations in adult de novo acute myelogenous leukemia: prevalence and clinical significance. *Blood* 1990;76:801-807.
32. Bowen DT, Frew ME, Hills R, Gale RE, Wheatley K, Groves MJ, Langabeer SE, Kottaridis PD, Moorman AV, Burnett AK, Linch DC: RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood* 2005;106:2113-2119.
33. Coghlan DW, Morley AA, Matthews JP, Bishop JF: The incidence and prognostic significance of mutations in codon 13 of the N-ras gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994;8:1682-1687.
34. Neubauer A, Dodge RK, George SL, Davey FR, Silver RT, Schiffer CA, Mayer RJ, Ball ED, Wurster-Hill D, Bloomfield CD: Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1994;83:1603-1611.
35. de Melo MB, Lorand-Metze I, Lima CS, Saad ST, Costa FF: N-ras gene point mutations in Brazilian acute myelogenous leukemia patients correlate with a poor prognosis. *Leuk Lymphoma* 1997;24:309-317.
36. Lee YY, Kim WS, Bang YJ, Jung CW, Park S, Yoon WJ, Cho KS, Kim IS, Jung TJ, Choi IY, .: Analysis of mutations of neurofibromatosis type 1 gene and N-ras gene in acute myelogenous leukemia. *Stem Cells* 1995;13:556-563.
37. Illmer T, Thiede C, Fredersdorf A, Stadler S, Neubauer A, Ehninger G, Schaich M: Activation of the RAS pathway is predictive for a chemosensitive phenotype of acute myelogenous leukemia blasts. *Clin Cancer Res* 2005;11:3217-3224.
38. Schaich M, Ritter M, Illmer T, Lisske P, Thiede C, Schakel U, Mohr B, Ehninger G, Neubauer A: Mutations in ras proto-oncogenes are associated with lower *mdr1* gene expression in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001;112:300-307.

39. Bos JL, Verlaan-de VM, van der Eb AJ, Janssen JW, Delwel R, Lowenberg B, Colly LP: Mutations in N-ras predominate in acute myeloid leukemia. *Blood* 1987;69:1237-1241.
40. Chin YM, Bosco JJ, Koh CL: Analysis of ras gene mutations in acute myeloid leukemia by the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Singapore Med J* 1992;33:48-50.
41. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R: Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;93:3074-3080.
42. Karp JE, Lancet JE, Kaufmann SH, End DW, Wright JJ, Bol K, Horak I, Tidwell ML, Liesveld J, Kottke TJ, Ange D, Buddharaju L, Gojo I, Highsmith WE, Belly RT, Hohl RJ, Rybak ME, Thibault A, Rosenblatt J: Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. *Blood* 2001;97:3361-3369.
43. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, Feldman EJ, Greer J, Liesveld JL, Bruzek LM, Morris L, Park Y, Adjei AA, Kaufmann SH, Garrett-Mayer E, Greenberg PL, Wright JJ, Karp JE: A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2007;109:1387-1394.
44. Lancet JE, Karp JE: Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies: new horizons in therapy. *Blood* 2003;102:3880-3889.
45. Stone RM: Targeted agents in AML: much more to do. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:39-48.
46. Karp JE, Smith BD, Gojo I, Lancet JE, Greer J, Klein M, Morris L, Levis MJ, Gore SD, Wright JJ, Garrett-Mayer E: Phase II trial of tipifarnib as maintenance therapy in first complete remission in adults with acute myelogenous leukemia and poor-risk features. *Clin Cancer Res* 2008;14:3077-3082.
47. Dash A, Gilliland DG: Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:49-64.
48. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T: Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000;19:624-631.
49. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, Gruning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Buchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H: Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 2000;96:3907-3914.

50. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S: Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1911-1918.
51. Kelly LM, Gilliland DG: Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:179-198.
52. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La SR, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF: Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005;352:254-266.
53. Mrozek K, Bloomfield CD: Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;169-177.
54. Shih LY, Liang DC, Fu JF, Wu JH, Wang PN, Lin TL, Dunn P, Kuo MC, Tang TC, Lin TH, Lai CL: Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. *Leukemia* 2006;20:218-223.
55. Drabkin HA, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L, Zeng C, Baron A, Hunger SP, Varella-Garcia M, Gemmill R, Brizard F, Brizard A, Roche J: Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2002;16:186-195.
56. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33:451-458.
57. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620-625.
58. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD: The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-2302.
59. Fiegl M, Hiddemann W, Braess J: Aktuelle Therapiestrategien in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie. *Medizinische Klinik* 2007;102:309-316.
60. Stone RM, Mayer RJ: Treatment of the newly diagnosed adult with de novo acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993;7:47-64.
61. Bishop JF: The treatment of adult acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997;24:57-69.

62. Buchner T, Hiddemann W, Wormann B, Loffler H, Gassmann W, Haferlach T, Fonatsch C, Haase D, Schoch C, Hossfeld D, Lengfelder E, Aul C, Heyll A, Maschmeyer G, Ludwig WD, Sauerland MC, Heinecke A: Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 1999;93:4116-4124.
63. Buchner T, Hiddemann W, Berdel WE, Wormann B, Schoch C, Fonatsch C, Loffler H, Haferlach T, Ludwig WD, Maschmeyer G, Staib P, Aul C, Gruneisen A, Lengfelder E, Frickhofen N, Kern W, Serve HL, Mesters RM, Sauerland MC, Heinecke A: 6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): a randomized trial of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2003;21:4496-4504.
64. Estey EH, Thall PF, Cortes JE, Giles FJ, O'Brien S, Pierce SA, Wang X, Kantarjian HM, Beran M: Comparison of idarubicin + ara-C-, fludarabine + ara-C-, and topotecan + ara-C-based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blasts in transformation, or refractory anemia with excess blasts. *Blood* 2001;98:3575-3583.
65. Russo D, Malagola M, de VA, Fiacchini M, Martinelli G, Piccaluga PP, Damiani D, Candoni A, Michielutti A, Castelli M, Testoni N, Ottaviani E, Rondoni M, Pricolo G, Mazza P, Zuffa E, Zaccaria A, Raspadori D, Bocchia M, Lauria F, Bonini A, Avanzini P, Gugliotta L, Visani G, Fanin R, Baccarani M: Multicentre phase III trial on fludarabine, cytarabine (Ara-C), and idarubicin versus idarubicin, Ara-C and etoposide for induction treatment of younger, newly diagnosed acute myeloid leukaemia patients. *Br J Haematol* 2005;131:172-179.
66. Schmid C, Kolb HJ: Die allogene Stammzelltransplantation im Therapiekonzept der akuten myeloischen Leukämie. *Medizinische Klinik* 2007;102:317-323.
67. Barletta E, Gorini G, Vineis P, Miligi L, Davico L, Mugnai G, Ciolli S, Leoni F, Bertini M, Matullo G, Costantini AS: Ras gene mutations in patients with acute myeloid leukaemia and exposure to chemical agents. *Carcinogenesis* 2004;25:749-755.
68. Side LE, Curtiss NP, Teel K, Kratz C, Wang PW, Larson RA, Le Beau MM, Shannon KM: RAS, FLT3, and TP53 mutations in therapy-related myeloid malignancies with abnormalities of chromosomes 5 and 7. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:217-223.
69. Auewarakul CU, Lauhakirti D, Tocharoentanaphol C: Frequency of RAS gene mutation and its cooperative genetic events in Southeast Asian adult acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2006;77:51-56.

70. Sun X, Hung K, Wu L, Sidransky D, Guo B: Detection of tumor mutations in the presence of excess amounts of normal DNA. *Nat Biotechnol* 2002;20:186-189.
71. McDonnell MW, Simon MN, Studier FW: Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* 1977;110:119-146.
72. Ratilainen T, Holmen A, Tuite E, Haaima G, Christensen L, Nielsen PE, Norden B: Hybridization of peptide nucleic acid. *Biochemistry* 1998;37:12331-12342.
73. Orum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C: Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 1993;21:5332-5336.
74. Mora J, Puig P, Boadas J, Urgell E, Montserrat E, Lerma E, Gonzalez-Sastre F, Lluís F, Farre A, Capella G: K-ras gene mutations in the diagnosis of fine-needle aspirates of pancreatic masses: prospective study using two techniques with different detection limits. *Clin Chem* 1998;44:2243-2248.
75. Weber JL: Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Curr Opin Biotechnol* 1990;1:166-171.
76. Hertzberg MS, McDonald D, Mirochnik O: Rapid diagnosis of hemochromatosis gene Cys282Tyr mutation by SSCP analysis. *Am J Hematol* 1998;57:260-261.
77. Cesarman E, Inghirami G, Chadburn A, Knowles DM: High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol* 1993;143:845-856.
78. Jacobson DR, Mills NE: A highly sensitive assay for mutant ras genes and its application to the study of presentation and relapse genotypes in acute leukemia. *Oncogene* 1994;9:553-563.
79. Takeda S, Ichii S, Nakamura Y: Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Hum Mutat* 1993;2:112-117.
80. Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, Kahan J, Lubbert M, Lazcano O, Isaac G, McCormick F, Koeffler HP: N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood* 1993;82:590-599.
81. Thiede C, Bayerdorffer E, Blasczyk R, Wittig B, Neubauer A: Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 1996;24:983-984.
82. Elenitoba-Johnson KS, Bohling SD, Wittwer CT, King TC: Multiplex PCR by multicolor fluorimetry and fluorescence melting curve analysis. *Nat Med* 2001;7:249-253.

83. Barragan E, Bolufer P, Moreno I, Martin G, Nomdedeu J, Brunet S, Fernandez P, Rivas C, Sanz MA: Quantitative detection of AML1-ETO rearrangement by real-time RT-PCR using fluorescently labeled probes. *Leuk Lymphoma* 2001;42:747-756.
84. Dabritz J, Hanfler J, Preston R, Stieler J, Oettle H: Detection of Ki-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridisation probes. *Br J Cancer* 2005;92:405-412.
85. Dabritz, J, Preston, R, Hanfler, J, Oettle, H: Follow-up study of K-ras mutations in plasma of pancreatic cancer patients: Correlation with clinical features and CA19-9. *Pancreas* 2009, im Druck.
86. Sotlar K, Escribano L, Landt O, Mohrle S, Herrero S, Torrelo A, Lass U, Horny HP, Bultmann B: One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol* 2003;162:737-746.
87. Chen CY, Shiesh SC, Wu SJ: Rapid detection of K-ras mutations in bile by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping and melting curve analysis: comparison with restriction fragment length polymorphism analysis. *Clin Chem* 2004;50:481-489.
88. Bullock GC, Bruns DE, Haverstick DM: Hepatitis C genotype determination by melting curve analysis with a single set of fluorescence resonance energy transfer probes. *Clin Chem* 2002;48:2147-2154.
89. Haverstick DM, Bullock GC, Bruns DE: Genotyping of hepatitis C virus by melting curve analysis: analytical characteristics and performance. *Clin Chem* 2004;50:2405-2407.
90. Schalasta G, Arents A, Schmid M, Braun RW, Enders G: Fast and type-specific analysis of herpes simplex virus types 1 and 2 by rapid PCR and fluorescence melting-curve-analysis. *Infection* 2000;28:85-91.
91. Fuery CJ, Impey HL, Roberts NJ, Applegate TL, Ward RL, Hawkins NJ, Sheehan CA, O'Grady R, Todd AV: Detection of rare mutant alleles by restriction endonuclease-mediated selective-PCR: assay design and optimization. *Clin Chem* 2000;46:620-624.
92. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K: Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci* 1994;39:362-372.
93. Al-Soud WA, Radstrom P: Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001;39:485-493.
94. Liang DC, Shih LY, Fu JF, Li HY, Wang HI, Hung IJ, Yang CP, Jaing TH, Chen SH, Liu HC: K-Ras mutations and N-Ras mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements. *Cancer* 2006;106:950-956.

95. Bartram CR, Ludwig WD, Hiddemann W, Lyons J, Buschle M, Ritter J, Harbott J, Frohlich A, Janssen JW: Acute myeloid leukemia: analysis of ras gene mutations and clonality defined by polymorphic X-linked loci. *Leukemia* 1989;3:247-256.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
A	Adenin
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ASA	allelspezifische Amplifikation
ASO	allelspezifische Oligonukleotid-Hybridisierung
Asp	Aspartat
ATRA	<i>all-trans</i> -Retinolsäure (<i>all-trans-retinoic acid</i>)
β	Beta
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CBF	<i>Core-binding factor</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEBP α	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
CR	komplette Remission (<i>complete remission</i>)
C-terminal	Carboxyl-terminal
Cys	Cystein
Da	Dalton
DDR	Deutsche Demokratische Republik
del	Deletion
dest.	destillata
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ETO	<i>eight twenty-one</i>

FAB	<i>French-American-British Cooperative Group</i>
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
g	Gramm
G	Guanin
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating-factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
HLA	humanes Leukozytenantigen
HOX	homeobox
H-ras	Harvey-Ras
inv	Inversion
ITD	Interne Tandem-Duplikation
k	kilo, 10^3
K-ras	Kirsten-Ras
l	Liter
LB-Medium	Lysogeny-broth-Medium
μ	mikro, 10^{-6}
m	milli, 10^{-3}
m	Meter
MAP	mitogen-activated protein
MDR1	<i>multidrug resistance 1</i>
MDS	myelodysplastisches Syndrom
min	Minute
MLL	<i>mixed-lineage leukemia</i>
MPO	Myeloperoxidase
MYH11	<i>myosin, heavy chain 11, smooth muscle</i>
n	nano, 10^{-9}
NPM1	Nucleophosmin
N-ras	Neuroblastoma-Ras
NTC	Negativkontrolle (<i>no-template control</i>)
ω	Omega
OD	optische Dichte

p	pico, 10 ⁻¹²
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PML	<i>promyelocytic leukemia</i>
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
RAR α	<i>retinoic acid receptor alpha</i>
Ras	<i>rat adeno sarcoma</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RUNX1	<i>runt-related transcription factor 1</i>
Σ	Summe
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
SSCP	<i>Single strand conformation polymorphism</i>
STAT-5	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>
t	Translokation
T	Thymin
TAE	Trisacetat/EDTA-Puffer
U	Einheit (<i>unit</i>)
UV	ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
°C	Grad Celsius
%	Prozent

8.2 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Helmut Oettle für die Überlassung des Themas und die intensive wissenschaftliche Betreuung und Förderung während dieser Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Joachim Hänfler danke ich herzlich für die gute Einarbeitung, die intensive Betreuung im Labor und die vielen wertvollen Anregungen und Diskussionen. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat bei der Planung der Experimente zur Seite und unterstützte mich bei der Auswertung der Daten.

Für die gute Atmosphäre und die konstruktive Zusammenarbeit innerhalb der Laborarbeitsgruppe möchte ich mich außerdem herzlich bei Frau Monika Seifert und Herrn Dr. med. Jan Däbritz bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Dörken) bedanken, die mich im Verlauf meiner Arbeit unterstützten. Hier sei insbesondere die enge Zusammenarbeit mit der Studiengruppe von Herrn Prof. Dr. med. H. Riess und Herrn Privatdozent Dr. med. H. Oettle erwähnt.

Nicht zuletzt danke ich Frau Dr. rer. nat. Eva-Maria Schurek für die kritische Durchsicht des Manuskriptes, die vielen wertvollen Ratschläge und die liebevollen, aufmunternden Worte.

8.3 Eigenständigkeitserklärung

Ich, Roman Preston, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Hochsensitive Mutationsanalyse des K-ras-Protoonkogens im peripheren Blut von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie mittels quantitativer PCR“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 16.11.2009

8.4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge:

Preston R,* Däbritz J*, Hänfler J, Oettle H. Mutational analysis of K-ras codon 12 in blood samples of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 2010; 34(7):883-91. (*geteilte Erstautorenschaft)

Däbritz J*, Preston R,* Hänfler J, Oettle H. Follow-up study of K-ras mutations in plasma of pancreatic cancer patients: Correlation with clinical features and CA19-9. *Pancreas* 2009; 38(5):534-41. (*geteilte Erstautorenschaft)

Däbritz J, Hänfler J, Preston R, Stieler J, Oettle H. Detection of Ki-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR-clamping and hybridisation probes. *British Journal of Cancer* 2005; 92(2):405-12.

Kongressbeiträge:

Kreuzer S, Mensing A, Preston R, Vollenbröker B, Duning K, Buck F, Henning S, Saleem M, Peter-Katalinic J, Pavenstädt HJ. Proteome analysis in human podocyte culture: effects of vasopeptidase inhibitor AVE8048. Kongress für Nephrologie, Tübingen, 2008.

Däbritz J, Hänfler J, Preston R, et al. Analysis of K-ras mutations in plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridisation probes: Correlation with clinical findings. Poster, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Hannover, 2005.

Preston R, Däbritz J, Hänfler J, Hilbig A, Riess H, Oettle H. Detection of K-ras point mutations in tissue samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR-clamping and hybridization probes. Poster, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Innsbruck, Österreich, 2004.

Däbritz J, Preston R, Hänfler J, Riess H, Oettle H. Analysis of K-ras point mutations in tissue and plasma DNA of patients with pancreatic cancer by combining PNA clamping and hybridization probes. Poster, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Basel, Schweiz, 2003.

Hänfler J, Däbritz J, Preston R, Landt O, Lass U, Riess H, Oettle H. One-step genotyping and quantification of K-ras point mutations in tumor cells by combining PNA-clamping and hybridization probes. Poster, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, München, 2002.