

---

Aus dem Institut für Pathologie  
des Zentrums für Klinisch-Theoretische Medizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Dr. med Guido Sauter  
unter der Anleitung von PD Dr. Ronald Simon

**Mutationsanalyse von tumorrelevanten Genen**  
**(p53, HRAS und KRAS) in humanen Zelllinien**

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Sascha Baumann  
aus Hamburg  
Hamburg 2009

---

---

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

07.07.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prof. Dr. K. Pantel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Prof. Dr. K. Kutsche

---

---

**Für meine Familie**

---

# **I. Inhaltsverzeichnis:**

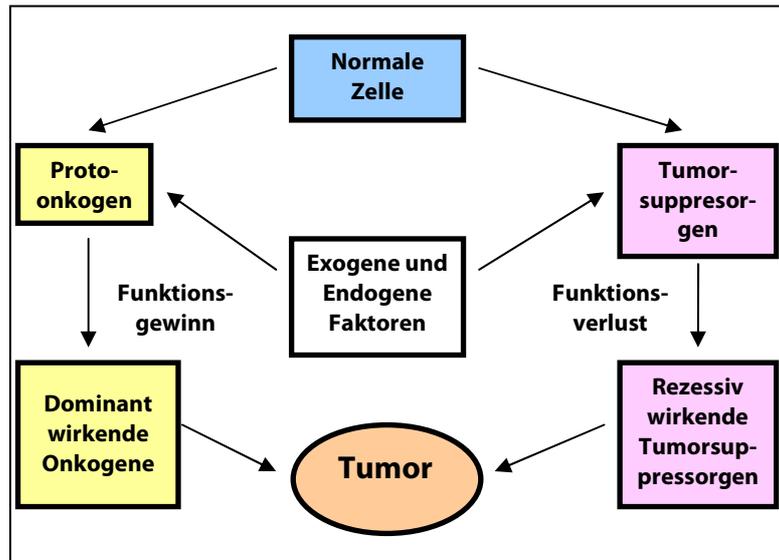
<b>I. Inhaltsverzeichnis:</b> .....	<b>I</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Tumorbiologie.....	1
1.2. Genetische Instabilität und p53 .....	5
1.3. RAS-Onkogene.....	10
1.4. Die Zelllinie als Entwicklungsgrundlage für Medikamente .....	15
1.5. Zielsetzung.....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1. Zelllinien-Repertoire .....	18
2.2. Sequenzierung.....	20
2.2.1. DNA-Isolation aus humanem Ursprungsgewebe .....	20
2.2.2. Polymerase Chain Reaction und Primersets.....	21
2.2.3. Gelelektrophorese als Nachweis der PCR-Produkte.....	25
2.2.4. Ethanolpräzipitation der Nukleinsäuren.....	26
2.2.5. DNA-Sequenzierung.....	27
2.2.6. Cycle-Sequencing .....	28
2.2.7. Detektion der Sequenz.....	29
2.2.8. Auswertung der Sequenzen.....	30
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1. Mutationsanalysen .....	34
3.1.1. Konzentration der Zelllinien-Extrakte.....	34
3.1.2. Zusammenstellung der p53-Analyse.....	35
3.1.3. Zusammenstellung der KRAS- und HRAS-Analyse .....	37
3.1.4. Zelllinien mit p53-, KRAS- und HRAS-Mutationen .....	39
3.1.5. Immunhistochemischer Nachweis.....	40
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>43</b>
<b>5. Resümee</b> .....	<b>51</b>
<b>II. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>III. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>IV. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>V. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>VI. Danksagung</b> .....	<b>XVI</b>
<b>VII. Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>XVII</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Tumorbologie

Schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts postulierte Theodor Boveri in seiner Arbeit „Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“: „Diese Urzelle des Tumors, wie ich sie im Folgenden nennen will, ist nach meiner Hypothese eine Zelle, die infolge eines Vorgangs einen Bestimmten, unrichtig kombinierten Chromosomenbestand besitzt. Dieser ist vor allem die Ursache der Wucherungstendenz, die auf alle Abkömmlinge der Urzelle, soweit sie durch reguläre mitotische Zweiteilung entstehen, übergeht“ (1). Boveris vorausschauendes Konzept aus dem Jahre 1914, dass es sich bei Krebs um eine Erkrankung handelt, die auf Veränderungen der Chromosomen und damit letztlich des genetischen Materials (DNA) zurückzuführen ist, konnte sich natürlich erst nach der Entdeckung der DNA durch den erfolgreichen Einsatz gentechnischer Methoden in der experimentellen und klinischen Krebsforschung vollständig durchsetzen und bestätigt werden. Eines der Hauptziele moderner Krebsforschung besteht in der Identifizierung der Gene, die für die Umwandlung von Normal- in Krebszellen verantwortlich sind, mit der Absicht, verbesserte diagnostische und therapeutische Verfahren für die Praxis zur Verfügung zu stellen. Gene, die für die Entstehung von Tumoren verantwortlich sind, werden allgemein als „Krebsgene“ bezeichnet. Aufgrund prinzipiell unterschiedlicher Funktionsweisen dieser Gene werden sie in zwei Gruppen eingeteilt, in Onkogene und Tumorsuppressorgene (2).

Beiden Gruppen ist gemeinsam, dass sie die Proliferation von Zellen und deren Teilung beeinflussen. An sich „harmlose“ Gene, die das normale Zellwachstum regulieren, können durch eine Mutation übermäßig aktiviert werden. Die „normale“ Version solcher Gene wird als Protoonkogen, die mutierte und aktivierte als Onkogen bezeichnet. Im Gegensatz dazu sind Tumorsuppressorgene durch einen Funktionsverlust, in der Regel durch eine inaktivierende Mutation charakterisiert (3). Die Abbildung 1 veranschaulicht die Wirkungsweise der Onkogene und Tumorsuppressorgene bei deren Aktivierung bzw. Inaktivierung.



**Abb. 1:** Exogene oder endogene Faktoren können zelluläre Protoonkogene aktivieren, so dass die auf zellulärer Ebene dominant wirkenden Onkogene zu einer unkontrollierten Proliferation der Zelle und in der Folge zur Tumorentstehung führen können. Im Gegensatz dazu können wiederum exo- oder endogene Faktoren zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgen führen. Diese auf zellulärer Ebene rezessiv wirkenden Gene sind dann nicht mehr in der Lage die Zellproliferation zu kontrollieren.

Die Ursachen für die Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgen sind Mutationen, die auf chromosomaler Ebene (z.B. Deletionen oder Amplifikationen ganzer Gene, Translokationen) oder auf subchromosomaler Ebene, das heißt auf der Ebene des DNA-Moleküls, entstehen können. Unterscheiden kann man zwischen strukturellen und numerischen Chromosomenmutationen. Zu den strukturellen Chromosomenveränderungen gehört die Translokation. Hierbei treten Brüche an einzelnen Chromosomen auf, wodurch die Bruchstücke ausgetauscht werden können. Die Amplifikation, beschreibt die Vervielfältigung von Chromosomenabschnitten. Bei der Deletion, kommt es zum Verlust von einzelnen Chromosomenabschnitten. Bei einer numerischen Chromosomenmutation weicht die Zahl einzelner oder aller Chromosomen vom normalen Chromosomensatz ab (4).

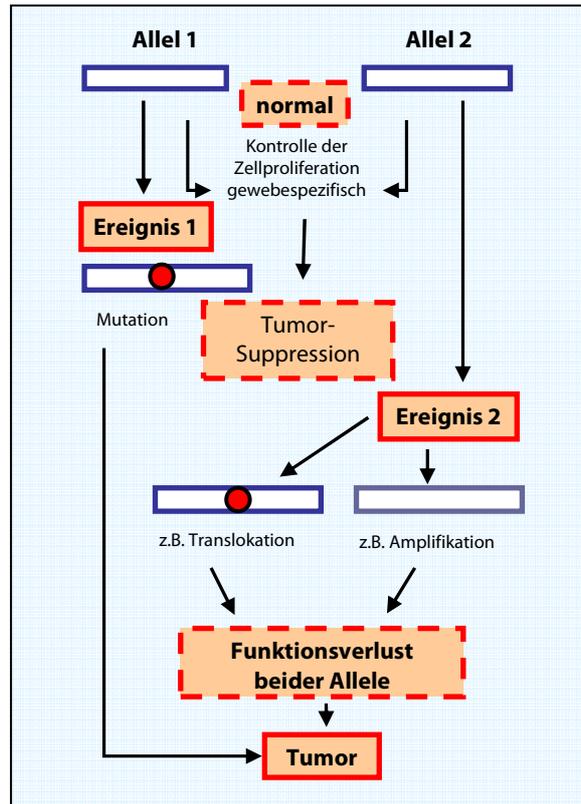
Auf subchromosomaler Ebene können einzelne Basen ausgetauscht werden (Punktmutation). Dies führt zu einer Änderung der Struktur des zugehörigen Proteins, wenn durch den Basenaustausch das Codon so geändert wird, dass eine andere Aminosäure codiert wird.

Gehen einzelne bis mehrere Basen verloren (Deletion), kommt es immer zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des zugehörigen Proteins, da das Leseraster geändert wird. Bei einer Insertion handelt es sich um den Zugewinn einer Base. Die nachfolgenden Basen rücken in Leserichtung auf, welches das Leseraster der nachfolgenden Codons in eben diese Richtung verschiebt (frameshift) (3). Je nachdem, ob Insertionen oder Deletionen exakt die drei Basen eines Aminosäure-Codons - oder ein vielfaches dieser 3 Basen, z.B. 6, 9, 12, oder 15 – betreffen oder ob sie ungleich drei Basen sind, kann das Leseraster des Gens zerstört werden oder nicht. Wird dieses zerstört, entsteht ein völlig neues Protein mit einer komplett veränderten (oder nutzlosen) Funktion. Wird das Leseraster nicht verändert, ist der Schaden womöglich nicht so groß. Genauso können Punktmutationen zu fatalen Veränderungen führen. Beispielsweise, wenn ein Stoppcodon entsteht und so die Aminosäurekette vorzeitig abbricht.

Wie bereits erwähnt, ist die Wirkungsweise der Tumorsuppressorgene, zu denen z.B. p53 gehört, und damit deren „Aktivierungsmechanismen“ prinzipiell von denen der Protoonkogene, zu denen z.B. die RAS-Gene zählen, verschieden. Tumorsuppressorgene sind eine Gruppe von Genen, die unter anderem die Teilung von Zellen kontrollieren. Erst der Verlust (Inaktivierung) führt zu unkontrollierter Zellteilung und in der Folge zu Tumorwachstum (5). Die Schwierigkeiten, den Verlust der Expression eines Tumorsuppressorgens auf molekularer Ebene nachzuweisen, kann einer der Gründe dafür sein, dass sie erst später als ihre natürlichen Gegenspieler, die Onkogene, entdeckt wurden, obwohl deren Existenz bereits erstmalig 1971 beim Retinoblastom von Knudson beschrieben wurde (6).

Ausgehend von seiner Beobachtung, dass im Tumorgewebe beide Allele defekt waren, postulierte er seine „Zwei-Stufen-Hypothese“ bezüglich des Funktionsverlusts von Tumorsuppressorgenen. Um ein Tumorwachstum auszulösen, müssen beide Allele des Gens defekt sein. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass sich Tumorsuppressorgene auf zellulärer Ebene rezessiv verhalten, d.h. ein gesundes Allel hält das normale Zellwachstum aufrecht. Es ist jeweils mindestens ein Ereignis an jedem der zwei Allele notwendig, damit der

Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens auftritt. Nach heutigem Kenntnisstand tritt in einem der beiden Allele zunächst eine subchromosomale Mutation, z.B. Punktmutation, Deletion oder Insertion, auf. Die Inaktivierung des zweiten Allels erfolgt in der Regel durch eine Chromosomenmutation (Translokation, Amplifikation). Die Abbildung 2 veranschaulicht Knudsons „Zwei-Stufen-Hypothese“, d.h. den Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens.



**Abb. 2: Funktionsverlust beider Allele eines Tumorsuppressorgens**

Das Tumorsuppressorgen p53 nimmt allerdings eine Sonderstellung ein, da es als Tetramer wirksam ist. Ist nur ein für p53 codierendes Gen mutiert, ergibt sich trotzdem eine starke Minderung der p53-Aktivität, da sich ein mutiertes und drei normale p53-Proteine zusammenlagern können und solch ein Komplex nicht mehr in der Lage ist, seine Aufgabe zu erfüllen (7). Somit ist für p53 fast die Definition eines Onkogens gegeben, da es nicht zum Verlust des zweiten Allels kommen muss, um einen Funktionsverlust herbeizuführen.

Es ist aber festzustellen, dass Tumore nicht durch solche Einzelereignisse ausgelöst werden. Vielmehr werden Tumorerkrankungen durch Mutationen von einer bislang unbekanntem Zahl von Genen verursacht. Allerdings haben alle bisherigen Untersuchungen des Genoms von Tumorzellen gezeigt, dass es keine allgemeingültige Sequenz von Mutationen gibt, die zum Tumorwachstum führt, sondern dass jeder Tumor in hohem Grade individuell ist.

### **1.2. Genetische Instabilität und p53**

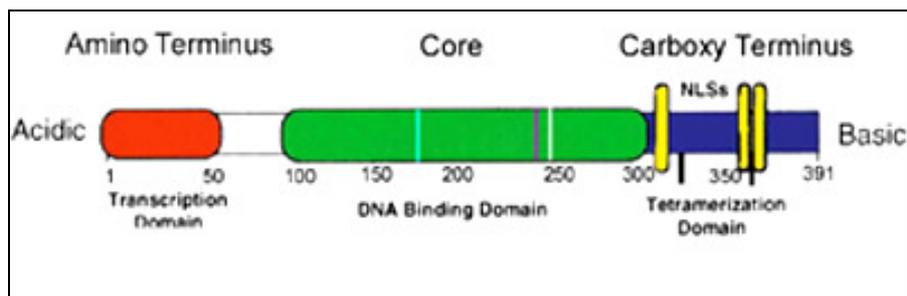
Die genetische Instabilität gilt als die zentrale molekularpathologische Eigenschaft der Krebszelle, die nicht nur für die Entstehung, sondern auch für den weiteren Progress des neoplastischen Wachstums verantwortlich gemacht wird (8) (9). Dabei lassen sich Manifestationen der genetischen Instabilität der Tumorzellen sowohl auf chromosomaler als auch auf DNA-Ebene nachweisen. Auf chromosomaler Ebene führt eine Störung der Chromosomenverteilung im Rahmen der Zellteilung bei den Tochterzellen zur Aneuploidie, die für eine gesteigerte Mutabilität der aneuploiden Zellen verantwortlich gemacht wird. Diese chromosomale Instabilität stellt eine Form der genetischen Instabilität bei humanen malignen Tumoren dar und lässt sich bei der Mehrzahl der malignen Tumoren nachweisen (10) (11) (12).

Eine weitere Form von genetischer Instabilität ist auf DNA-Ebene durch das Auftreten von Replikationsfehlern, wie Basenfehlpaarungen (Mismatches), Punktmutationen, kleinen Insertionen und Deletionen im Erbgut der Tumorzellen gekennzeichnet. Da diese Replikationsfehler vor allem in den repetitiven DNA-Sequenzen, den sogenannten Mikrosatelliten, des Genoms auftreten, wird diese Form der genetischen Instabilität als Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) bezeichnet. Sie ist auf einen Ausfall der in jeder normalen Zelle vorhandenen DNA-Mismatch-Reparatur-Mechanismen zurückzuführen (13).

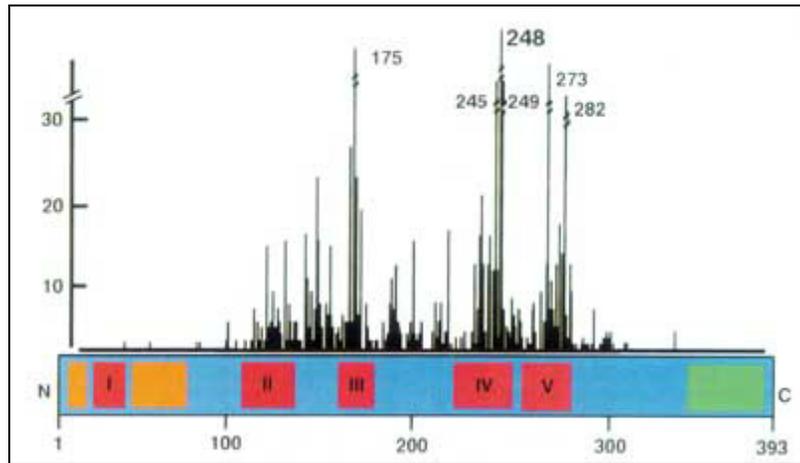
Eines der wichtigsten Gene, die mit genetischer Instabilität in Verbindung gebracht werden, ist das p53-Gen, bei dessen Ausfall es zu einer Akkumulation von einer Vielzahl verschiedener weiterer Mutationen kommen kann (14) (8) (9). Das p53-Gen gehört zu den häufigsten in humanen Tumoren mutierten Genen. In der Regel

handelt es sich um inaktivierende Mutationen, oft als Kettenabbrüche oder Punktmutationen, die zu funktionslosen Proteinen führen. Es wird angenommen, dass ca. 50% aller menschlichen Tumoren auf Grund von p53-Mutationen entstehen. Die Ursache für diese Häufung von Mutationen in Tumoren ist in der besonderen Funktion des p53 zu sehen. Das p53-Gen codiert für das gleichnamige, im Zellkern lokalisierte Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kD. Es ist die wichtigste Kontrollinstanz für die Unversehrtheit der DNA, weshalb ihm 1992 der Titel „Wächter des Genoms“ verliehen wurde. Die Konzentration des p53-Proteins in einer normalen Zelle ist außerordentlich gering und seine Halbwertszeit liegt nur bei maximal 20 Minuten. Bei DNA-Schäden steigt der p53-Spiegel in einer Zelle aber stark an (4). Das p53 ist ein Protein aus der Familie der proapoptotischen Tumorsuppressorgene.

Es bindet an spezifische DNA-Sequenzen und aktiviert dadurch die Transkription von verschiedenen Genen, die die erforderlichen Bindungsstellen in Form von vier Kopien der pentameren Sequenz PuPuPuC (A/T) enthalten. Die Sequenzen sind in entgegengesetzter Richtung angeordnet, mit einem Abstand von bis zu 13bp zwischen den Paaren. Die Struktur und die Bindung des p53-Proteins an die DNA-Sequenzen sind in den folgenden Abbildungen wiedergegeben (7).



**Abb. 3: Das p53-Protein kann in drei funktionelle Untereinheiten unterteilt werden.** Das Aminoende (rot) ist entscheidend für die Funktion des Proteins als Transkriptionsfaktor. Grün dargestellt ist die DNA-bindende-Domäne. Das Carboxylende sorgt für die Oligomerisation des Proteins. Zusätzlich sind die für die Lokalisation des Proteins im Zellkern maßgeblichen Sequenzen dargestellt (gelb).

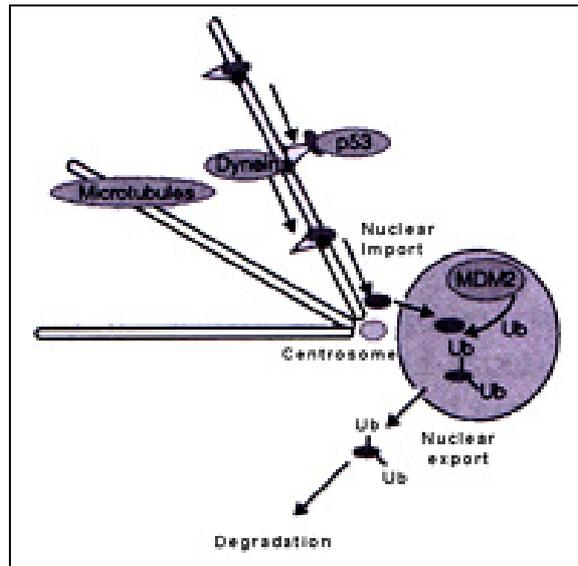


**Abb. 4: Innerhalb der DNA-bindenden-Domäne finden sich nahezu alle bekannten Mutationsstellen im p53-Gen.** Dargestellt ist die Frequenz der Mutationen für einzelne Codons. Mit römischen Ziffern markiert sind die hochkonservierten Anteile des Proteins.

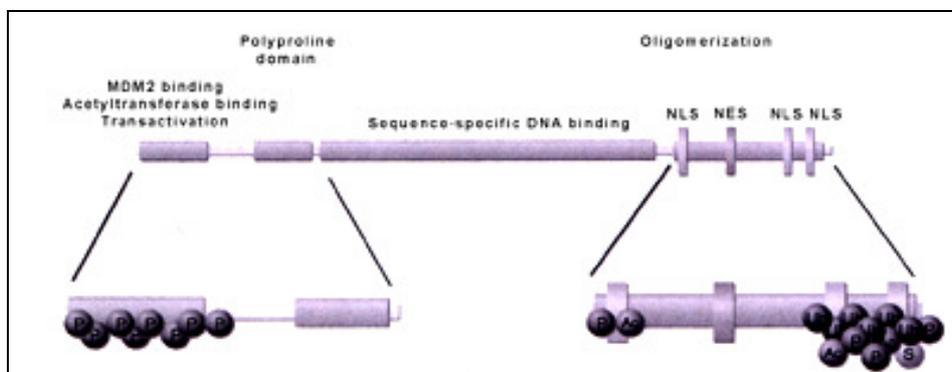
Die Transkription des p53-Gens wird durch verschiedene Arten von Stress aktiviert, wie z.B. DNA-Schäden, Telomer-Abbau, Onkogenaktivierung, Hypoxie und den Verlust von normalen Wachstumssignalen (15). Die Aktivierung von p53 kann sowohl Differenzierung, Alterung, DNA-Reparatur und Inhibition der Angiogenese als auch Anhalten des Zellzykluses und Apoptose auslösen (16). Das p53 fungiert dabei als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor und bewirkt die Aktivierung oder Inhibierung der Transkription verschiedener Gene. Im Rahmen der p53-induzierten Apoptose sind verschiedene Proteine bekannt, deren Expression durch p53 induziert wird und die nachfolgend sowohl über den mitochondrialen als auch über den Todes-Rezeptor-Weg eine Apoptose auslösen können (17). Mitochondriale Proteine, deren Transkription von p53 induziert wird, sind z.B. Bax, NOXA, PUMA und p53AIP1. Sie triggern die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung des Apaf-1/Caspase-9 Apoptosom-Komplexes (18) (19) (20) (21) (22). Auch die Todes-Rezeptor-Proteine Fas und Killer/DR5 sowie das Protein PIDD, das die sogenannte Todesdomäne enthält, werden von p53 induziert (23).

Kontrolliert wird die Funktion von p53 durch Regulation seiner Transkription, Translation, Proteinstabilität, Lokalisation und Aktivität. Als wichtigste Kontrollinstanz fungiert das Protein MDM2, das die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor vermindern und dessen Abbau beschleunigen kann. Die

Transkription von MDM2 wird von p53 im Sinne eines positiven Feedbacks gesteuert. Die Induktion von p53 als Reaktion auf Zellstress inhibiert die Funktion von MDM2 auf verschiedenen Wegen (24). So wird die Interaktion von MDM2 im Falle eines DNA-Schadens durch die Kinasen Chk1 und Chk2 durch Phosphorylierung des aminoterminalen Anteils von p53 negativ beeinflusst und verhindert so seinen Abbau (25) (26).



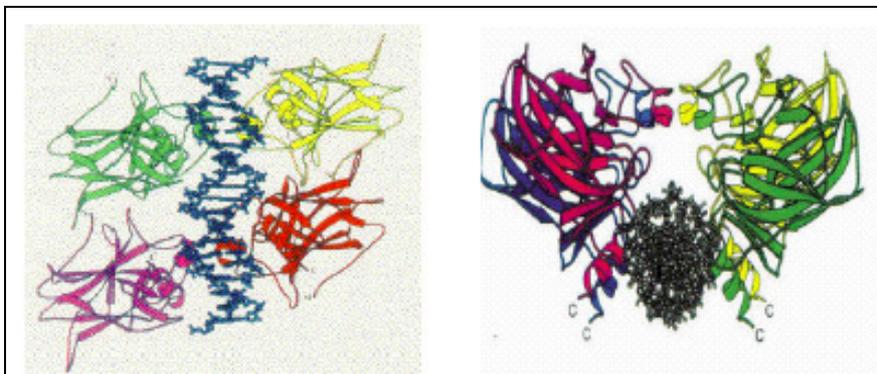
**Abb. 5: Modell für Regulation der subzellulären Lokalisation von p53.** Assoziation an Mikrotubuli dirigiert p53 in Richtung Zellkern mittels elektrostatischer Wechselwirkungen mit Dynein. Für den Import in den Zellkern sorgt die Bindung des Carboxylendes an Rezeptoren des Zellkerns. Der Export von p53 und MDM2 aus dem Zellkern wird vermutlich durch Ubiquitinierung vermittelt.



**Abb. 6: Die für die Regulation der p53-Aktivität durch posttranslatorische Modifikation durch Acetylierung (Ac), Phosphorylierung (P), Sumoylierung (S) und Ubiquitinierung (Ub) maßgeblichen Bindungsstellen sind hier wiedergegeben.**

Zusätzlich wird die Funktion und Aktivität von p53 durch seine Lokalisation im Zellkern, also durch seinen Im- und Export in bzw. aus demselben beeinflusst (27). Auch andere posttranslationale Modifizierungen wie Acetylierung und die Bindung an das ubiquitinähnliche SUMO-1-Protein steuern die Aktivität von p53 (28) (29) (30). Je nachdem, in welcher Phase des Zellzykluses die DNA-Schäden registriert werden, kann p53 die Zellteilung zu verschiedenen Zeitpunkten stoppen. Ein G1-Block, also die Arretierung der Zelle vor dem Restriktionspunkt, wird von p53 durch eine vermehrte Expression von p21 verursacht. Das p21 hemmt das weitere Fortschreiten des Zellzykluses durch eine Hemmung des D-Cyclin/CDK4/6-Komplexes. Ein G2-Block erfolgt, wenn das Genom unvollständig oder fehlerhaft repliziert wurde oder die Schädigung erst nach der S-Phase auftrat. p53 verhindert über eine Reihe von Schritten die Aktivierung des B-Cyclin/CDK-1-Komplexes und damit die Einleitung der Mitose.

Wie bereits erwähnt, findet sich in über der Hälfte aller menschlichen Tumore eine Mutation im p53-Gen. Erschwerend kommt beim p53 hinzu, dass es nicht alleine, sondern als Tetramer aktiv ist (siehe Abbildung 7).



**Abb. 7: p53 gebunden an DNA. In vivo existiert p53 als Tetramer.** In vitro ist eine DNA-Bindung auch ohne eine Oligomerisation beschrieben und einzelne Anteile der zentralen Region können mit etwa einem Fünftel der Affinität des intakten Proteins an DNA binden. In der Zelle ist die Tetramerisation jedoch unabdingbar für die adäquate Funktion von p53.

Ist nur ein für p53 codierendes Gen mutiert, ergibt sich trotzdem eine starke Minderung der p53-Aktivität, da sich ein mutiertes und drei normale p53-Proteine zusammenlagern können und solch ein Komplex nicht mehr in der Lage ist, seine beschriebene Aufgabe zu erfüllen (7).

Auf Grund der oben beschriebenen Funktionsprinzipien von p53 ist es nachvollziehbar, dass Tumore mit einer p53-Mutation auch sehr schlecht auf Chemotherapie und Radiotherapie ansprechen. Sinn dieser Therapie ist es, die DNA der Tumorzellen zu schädigen. Registriert jedoch kein funktionierendes p53 die Schäden, dann kann die Zelle auch nicht in die Apoptose gehen und die Tumorzelle bleibt erhalten. Dieser Funktionsverlust von p53 erklärt die besondere Bedeutung für die Therapieauswahl bei einem Tumorpatienten. Bei einem Tumor mit inaktivem p53 ist somit die Prognose für den Patienten in der Regel wesentlich schlechter als bei funktionsfähigem p53 (4).

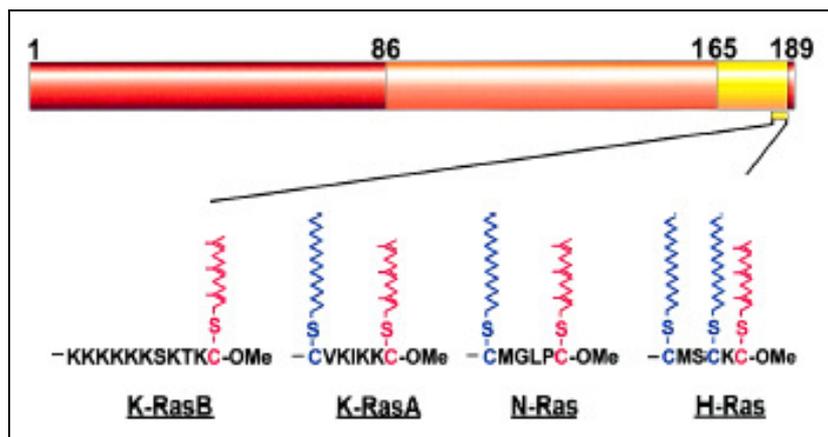
Aus diesem Grund ist es bei der Entwicklung neuer Medikamente äußerst wichtig, den p53 Status zu kennen, wenn man diese in Zelllinien testet. Da es durch die Inaktivierung von p53, wie bereits erwähnt, zur sogenannten genetischen Instabilität kommt, erklärt sich die Akkumulation von verschiedenen Mutationen durch die fehlende Regulation von p53. So kann es zu Sekundärmutationen kommen, die wiederum zu Resistenzentwicklungen führen können. Eine klinisch wichtige Sekundärmutation tritt z.B. häufig an den RAS Genen auf. So sollte man einen kompletten Mutationsstatus der Zelllinie aufstellen, an welcher man dann sein Medikament erfolgreich testen kann.

### **1.3. RAS-Onkogene**

Das RAS (Rat Sarcoma) ist ein Protoonkogen, das für ein sogenanntes kleines G-Protein codiert. Es wurde 1981 vom amerikanischen Molekularbiologen Robert Allan Weinberg beschrieben. Die RAS-Proteine zählen zu den wichtigsten bekannten Onkogenen. Es wird geschätzt, dass ihre Mutation an der Entstehung von bis zu 10% aller bösartigen Erkrankungen Anteil hat (31). Eine Punktmutation im Codon12 des HRAS-Gens war die erste somatische Punktmutation, die in humanen Tumoren entdeckt wurde und etablierte damit somatische Mutationen als eine gemeinsame Ursache der Tumorigenese. Seitdem sind über 11000 Mutationen in den drei RAS-Genen (HRAS, KRAS und NRAS) in Codon12, 13 und 61 in der Literatur beschrieben worden (32). Die drei humanen RAS-Gene werden so bezeichnet, weil zwei RAS-Gene zu retroviralen Onkogenen homolog sind, daher

die Bezeichnung entsprechend der viralen Onkogene: H(arvey)RAS (33), K(irsten)RAS (34), das dritte RAS-Gen wurde ursprünglich aus einem humanen Neuroblastom isoliert und hat daher die Bezeichnung NRAS (35).

Die Basensequenz der RAS-Gene ist zu 90% identisch, nur die carboxyterminalen 25 Aminosäuren (hypervariable Region) unterscheiden sich stark voneinander. Diese C-terminalen Sequenzen werden auch für die unterschiedlichen biologischen Effekte dieser Isoformen verantwortlich gemacht (36). Die Variabilität der C-terminalen Sequenzen der RAS-Isoformen führt zu unterschiedlichen Prozessierungsmustern in der Zelle. Alle Isoformen werden nach der Synthese an löslichen Ribosomen am C-Terminus posttranslational modifiziert (37). Die RAS-Gene kodieren vier 21kD große Proteine (H-, N-, K4A- und K4B-RAS-Proteine), die zu 85% homolog sind (siehe Abbildung 8) (38) (39).



**Abb. 8: Sequenzvergleiche der RAS-Proteine** (Identische Sequenz im Bereich der rot dargestellten Switch-I-Region und der orange dargestellten Switch-II-Region. Sie variieren jedoch in der gelb dargestellten hypervariablen Region) (40)

RAS-Gene werden bei Säugetieren in allen Zelltypen und Organen exprimiert. Je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium des Säugetiers gibt es jedoch Unterschiede in der Expression. Das HRAS-Gen wird vorzugsweise in Haut und Skelettmuskel exprimiert, das KRAS-Gen vorrangig in Darm und Thymus (31) (41) (42) (43). Die Expression des NRAS-Gen ist ebenfalls im Thymusgewebe und in männlichen Keimzellen spezifisch hochreguliert (31) (43) (42) (41).

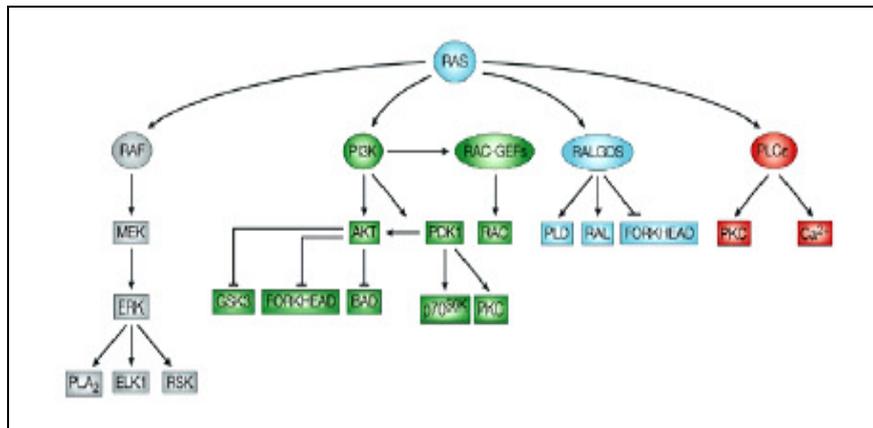
In den meisten menschlichen Tumoren trägt die Aktivierung von RAS-Onkogenen wesentlich zur Malignität bei. Deshalb wurde seit der Entdeckung der transformierenden RAS-Allele in menschlichen Tumoren im Jahr 1982 besonders intensiv über die RAS-Gene geforscht und ihre Rolle in der neoplastischen Transformation näher bestimmt. Das Verteilungsmuster der onkogenen Formen der RAS-Gene (siehe Tabelle 1) deutet auf einen funktionellen Unterschied hin, denn organspezifischer Krebs mit aktivierten RAS-Onkogenen ist häufig mit einer spezifischen RAS-Isoform assoziiert (42) (32).

Gen	Tumorinzidenz	Literatur	
HRAS	Blasenkarzinome (7% - 17%)	(43) (31)	
	Nierenkarzinome (10% - 13%)	(41) (42)	
KRAS	Lunge: Adenokarzinom (33%)	(43) (31) (41) (42)	
	Lunge: nichtkleinzellige Karzinome (33%)		
	Kolon: Adenome (50%)		
			Kolon: Adenome mit fam. adenomatöser Polyposis (7% - 13%)
			Kolon: Adenokarzinome (44% - 47%)
Pankreaskarzinome (75% - 93%)			
NRAS	Melanome (8% - 19%)	(43) (31) (41) (42)	
	Leberkarzinome (30%)		
	Myeloische Erkrankungen:		
	Myelodysplastisches Syndrom (38% - 41%)		
			Idiopathische Myelofibrose (22%)
	Akute myeloische Leukämie (19% - 70%)		
	Chronisch myeloische Leukämie:		
	chronische Phase (17%)		
			akute Phase (50%)
Akute lymphatische Leukämie (11%)			

**Tab. 1:** Inzidenz mutierter RAS-Isoformen in menschlichen Tumoren

Die unterschiedliche Inzidenz der RAS-Isoformen in bestimmten menschlichen Tumoren wirft die Frage nach der molekularen Bedeutung auf. Entweder wird die Gewebespezifität durch das RAS-Protein selbst oder durch RAS signalkettenabhängige differentielle Genexpression verursacht (44).

RAS-Proteine sind an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen von der Zelloberfläche bis zu den zyttoplasmatischen Zielen beteiligt und vermitteln verschiedene Varietäten von zellulären Antworten. Dabei nimmt RAS eine Schlüsselrolle in mehreren Signaltransduktionswegen ein, wie z.B. dem PI3K/AKT- oder dem RAF/MAPK-Signalweg, wie in der Abbildung 9 dargestellt.



**Abb. 9: RAS und Effektorinteraktion:** Nach Aktivierung von RAS-Proteinen können eine Vielzahl von Effektoren aktiviert werden, die unterschiedliche Signalwege einleiten.

Zelluläre Antworten der wichtigsten RAS-Effektoren sind unter anderem Proliferation, Transformation, zytoskeletale Reorganisation und Zellüberleben (45). Mutationen im RAS-Gen führen dazu, dass ein RAS-Protein entsteht, das nicht mehr in der Lage ist, sich selbst zu deaktivieren. Sie geben der Zelle also ständig den Befehl zu wachsen, ganz gleich ob ein Wachstumsfaktor gebunden hat oder nicht (4). Onkogene Varianten von KRAS sind mutierte, konstitutiv-aktive Proteine, die dauerhaft GTP gebunden haben. Die Ursache dafür können Mutationen in den Nukleotid-Bindungsstellen des Proteins sein, welches die Hydrolyse von GTP zu GDP verhindert wird (siehe Abbildung 10) (46).

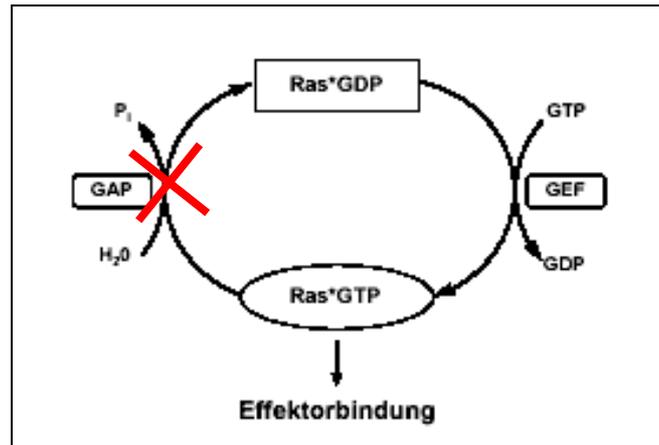


Abb. 10: Schalterfunktion von RAS-Proteinen

RAS-Proteine haben dabei eine Schalterfunktion, die zum Einen durch Guanosinnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und zum Anderen durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert werden. GEFs katalysieren den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP. RAS-GTP bindet Effektorproteine und leitet die Signalkaskade ein. Die Inaktivierung von RAS wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) vermittelt, welche die Hydrolyse von GTP zu GDP und freiem Phosphat katalysieren (47) (48) (49).

Die Vielzahl der Effektor- und Regulatorproteine, aber auch externer Signale, die Einfluss auf die Signaltransduktion von RAS-Proteinen nehmen, verdeutlicht, dass diese Proteine an komplexen Netzwerken der Signaltransduktion beteiligt sind und eine direkte Linearität der Signalkaskaden in den wenigsten Fällen gegeben zu sein scheint.

Im Rahmen der Diagnostik gehört das Onkogen KRAS, z.B. bei Pankreas- und Kolonkarzinomen zu den bislang am besten geeigneten molekularbiologischen Markern, da sie schon in frühen Stadien der Kanzerogenese auftreten und damit für eine Tumorfrüherkennung möglicherweise geeignet sind. Da die Mutationen im Wesentlichen an definierten Positionen in Codon 12 und 13 auftreten, können sie durch Hybridisierung mit wenigen Oligonukleotid-Sonden identifiziert werden und durch Vervielfältigung der mutierten DNA selbst bei einem Anteil von weniger als 1% des Probenmaterials erkannt werden (50).

Eine weitere besondere Bedeutung von KRAS aus heutiger klinischer Sicht ist, dass vor zwei Jahren mit Cetuximab ein Medikament für die effektive Therapie von Kolonkarzinomen zugelassen wurde. Cetuximab bindet an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors. Durch diese Bindung werden die Aktivierung des Rezeptors und die nachgeschalteten Signalkaskaden gehemmt, wodurch sowohl die Invasion der Tumorzellen in gesundes Nachbargewebe als auch die Ausbreitung der Tumore in neue Körperregionen vermindert werden. Darüber hinaus wird angenommen, dass es die Fähigkeit der Tumorzellen, die durch Chemo- und Strahlentherapie verursachten Schäden zu reparieren, verringert sowie die Ausbildung neuer Blutgefäße in den Tumoren herabsetzt, was zu einer generellen Hemmung des Tumorwachstums zu führen scheint (51). Aber schon rasch hat sich gezeigt, dass etwa ein Drittel der Kolonkarzinompatienten resistent gegen Cetuximab sind. Die Ursache hierfür wurde in KRAS-Mutationen gefunden, da eine Anti-EGFR-Therapie nicht wirken kann, wenn eine RAS-Mutation weiter unten im Pathway vorhanden ist.

Eine Anti-EGFR-Therapie, wie sie heutzutage standardmäßig ohne Prüfung auf RAS-Mutationen durchgeführt wird, wäre bei vorhandener RAS-Mutation somit ohne Erfolg. Um genauere Einblicke zu erlangen, welche funktionellen Auswirkungen KRAS-Mutationen auf die Biologie der Zelle und auf die Blockade des EGFR-Signalwegs haben können und auch um neue Medikamente zu entwickeln, die Resistenzen überwinden, sind wieder Zelllinien nötig, bei denen der Mutationsstatus bekannt ist.

### **1.4. Die Zelllinie als Entwicklungsgrundlage für Medikamente**

Bei Zelllinien handelt es sich allgemein um Zellen einer Gewebeart, die sich im Laufe einer Zellkultur unbegrenzt fortpflanzen können. Als Zellkultur wird dabei die Kultivierung tierischer oder pflanzlicher Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus bezeichnet. Es werden sowohl immortalisierte Zelllinien als auch primäre Zellen kultiviert. Von einer Primärkultur spricht man, wenn eine nicht immortalisierte Zellkultur direkt aus einem Gewebe gewonnen wird. Heutzutage

finden Zellkulturen in der biologischen und medizinischen Forschung, Entwicklung und Produktion breite Verwendung.

Aber schon seit den Anfängen der naturwissenschaftlichen Forschung gab es Bestrebungen, Zellen und Gewebe auch außerhalb eines Organismus am Leben zu erhalten, um sie so nähergehend untersuchen zu können. Erstmals 1885 gelang es Wilhelm Roux embryonale Hühnerzellen für mehrere Tage in einer Salzlösung am Leben zu erhalten, um somit Grundkenntnisse zu entwickeln. Im Jahr 1913 zeigte Alexis Carrel, dass Zellen, sofern sie ernährt und aseptisch gehalten werden, auch längere Zeit außerhalb eines Organismus in Zellkultur wachsen können. Eine unsterbliche menschliche Zelllinie wurde erstmals in den Jahren 1951/1952 aus einem Zervixkarzinom etabliert. Diese Zelllinie wurde später unter dem Namen HeLa bekannt, welche auch in dieser Arbeit untersucht wird.

Heutzutage finden Zellkulturen in der Herstellung von biotechnischen Produkten, sowie in Forschung und Entwicklung eine breite Anwendung. Der Stoffwechsel, die Teilung und viele weitere zelluläre Prozesse können so in der Grundlagenforschung untersucht werden. Weiterhin werden kultivierte Zellen als Testsysteme eingesetzt. Durch diese Möglichkeit wird die Anzahl von Tierversuchen drastisch reduziert. Beispielsweise bei der Untersuchung der Auswirkung von Substanzen auf die Signaltransduktion und Toxizität der Zelle bietet die Zellkultur weitreichende Möglichkeiten (52) (53).

So lassen sich auf der Internetplattform Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) beispielsweise 582 Artikel zu den Schlagwörtern „cell line und gefitinib“ sowie „cell line und herceptin“ mit 427 Artikeln finden. Jenes zeigt die intensive Nutzung von Zelllinien in der onkologischen Medikamentenforschung und somit den bedeutenden Stellenwert von Zelllinien.

## 1.5. Zielsetzung

Da Tumore, wie bereits erwähnt, verschiedene Mutationen aufweisen, die es festzustellen gilt, braucht man um eine gezielte Therapie anwenden zu können einen Status der Mutationen in den jeweiligen Tumoren. Zur Erstellung eines solchen Profils bedient man sich in der Forschung der Zelllinienversuche, um an diesen die Mutationen als ersten Schritt zur Entwicklung neuer Therapien darzustellen. Vorteile der Zelllinien sind ihre leichte Verfügbarkeit bei geringem Kostenaufwand und ihre ethische Vertretbarkeit. Die Zellkulturen, die aus dem Ursprungsgewebe, also dem Tumor gewonnen werden, haben oftmals noch die Charakteristika des Ursprungstumors. Ist eine spezifische Mutation erkannt, gegen die ein Therapeutikum entwickelt werden soll, wird dieses Medikament in einer festgelegten Kaskade erforscht. Aus dem Targetkandidaten werden die Zellen gewonnen, die dann in Zellkulturen angelegt werden. In dieser Stufe erfolgen dann die jeweiligen Versuche. Führen die Medikamente in dieser Stufe zum Erfolg, geht man über zum Tierversuch und schlussendlich erfolgt dann zunächst in kontrollierten Studien die Anwendung am Menschen.

Ziel dieser Arbeit war es, Mutationen von drei bekannten tumorrelevanten Genen (p53, HRAS, KRAS) in einem Set von 56 humanen Zelllinien zu analysieren und den Mutations- und Expressionsstatus dieser Gene zu vergleichen. Der Status soll es ermöglichen, dass in weiterführender Forschung die untersuchten Zelllinien nicht mehr profiliert werden müssen. Es wurde deshalb ein breitgefächertes Spektrum von 56 Zelllinien ausgewählt, wobei ein Teil (22 Zelllinien) des NCI60-Panel analysiert wurde, um eine Vergleichbarkeit zu anderen Arbeiten zu schaffen. Die systematische Statusaufnahme ermöglicht es, dass Zelllinien aufgedeckt werden, die z.B. mehrere Mutationen aufweisen und somit speziell zur Erforschung von bestimmten Therapieresistenzen herangezogen werden können.

Die Identifikation von mutierten Tumorgenen in dem vorliegenden Zelllinien-Repertoire in Kombination mit dem pharmakologischen und molekularen Profil dieser Zelllinien wird es erlauben, dass eine bessere Interpretation der bekannten Krebsmedikamente und ihrer Einsatzmöglichkeiten möglich wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zelllinien-Repertoire

In der vorliegenden Arbeit wurden 56 humane Zelllinien unterschiedlichster Gewebe untersucht, diese sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Die Einteilung erfolgte dabei nach ihrem Herkunftsorgan. Zudem sind aus folgender Tabelle weitere Details der Zelllinien zu entnehmen. Dazu gehören die Gewebeart, der Tumortyp und die Kurzbezeichnung der Zelllinie. All diese Zelllinien wurden auf gleiche Weise untersucht, siehe dazu die Abschnitte 2.2.1 – 2.2.8.

Organ	Herkunftsgewebe	Zelllinie
Kolon	kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C	DLD-1
Kolon	kolorektales Adenokarzinom	COLO 320 DM
Kolon	kolorektales Adenokarzinom	HCT-8
Kolon	kolorektales Adenokarzinom	COLO 201
Kolon	kolorektales Adenokarzinom (stammend aus Aszites)	SK-CO-1
Kolon	epithelial; kolorektales Adenokarzinom Duke`s Typ C (stammend aus Lymphknoten)	SW-620
Kolon	kolorektales Adenokarzinom	HT 29
Kolon	kolorektales Adenokarzinom, Duke`s Typ C	HCT-15
Kolon	Adenokarzinom, Duke`s Typ D (stammend aus Aszites)	COLO 205
Kolon	kolorektales Adenokarzinom	HCT-116
Leber	hepatozelluläres Karzinom	HEP G2
Ovar	Adenokarzinom, (stammend von Aszites)	OVCAR-3
Ovar	Adenokarzinom	OVCAR-4
Ovar	Adenokarzinom	OVCAR-5
Ovar	Adenokarzinom	OVCAR-8
Ovar	Adenokarzinom	OC-2
Knochenmark	Leukämie (stammend aus Pleuraerguss)	K-562
Knochenmark	Leukämie	HL-60 (TB)
Haut	malignes Melanom	SK-MEL-28
Haut	malignes amelanotisches Melanom (stammend aus Lymphknoten)	MEL-HO
Haut	malignes Melanom (stammend aus inguinalem Lymphknoten)	IGR-1
Haut	Epidermis; epidermoides Karzinom	A 431
Haut	malignes Melanom	HACAT
Haut	malignes Melanom	A-375

Organ	Herkunftsgewebe	Zelllinie
Brust	Karzinom (stammend aus Aszites)	ZR-75-I
Brust	Brustdrüse	HBL-100
Brust	Brustdrüse; duktales Karzinom (stammend aus Lymphknoten)	BT 549
Brust	Brustdrüse; duktales Karzinom	HS-578T
Brust	Brustdrüse, epithelial; Adenokarzinom (stammend aus Pleuraerguss)	MCF 7
Brust	Brustdrüse; duktales Karzinom	MDA-MB-435
Brust	Brustdrüse; Adenokarzinom	MDA-NEO
Lunge	Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom	NCI-H23
Lunge	Nicht-kleinzelliges Karzinom	NCI-H226
Lunge	Nicht-kleinzelliges Karzinom	NCI-H322M
Lunge	Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom	NCI-H522
Niere	Klarzellkarzinom	CAKI-2
Niere	transformiert durch Adenovirus 5 DNS	293
Niere	Adenokarzinom	786-0
Gehirn	multiformes Glioblastom	T98G
Gehirn	links parietookzipital; Glioblastom	SNB-19
Gehirn	Glioblastom	GaMG
Gehirn	Gliazelle; multiformes Glioblastom	DBTRG-05MG
Gehirn	Glioblastom	U-343MG
Gehirn	Glioblastom	172
Knochen	Osteosarkom	SAOS-2
Harnwege	Harnblasenkarzinom	ECV 304
Harnwege	Harnblase; Transitionalzellkarzinom	J-82
Harnwege	Harnblase; Squam.Zellkarzinom	SCABER
Harnwege	Harnblasenkarzinom	5637
Harnwege	Harnblase; Transitionalzellkarzinom	TCC-SUP
Harnwege	Harnblase; Transitionalzellkarzinom, Grad II	RT-II2
Gebärmutter	Zervixkarzinom	HELA
Schilddrüse	oxyphiles papilläres Karzinom	ONCO-DG-I
Schilddrüse	anaplastisches Karzinom	CAL-62
Schilddrüse	follikuläres Karzinom	ML-1
Schilddrüse	Schilddrüsenkarzinom	B-CPAP
Schilddrüse	Schilddrüsenkarzinom	8505C

Tab. 2: Verwendete Zelllinien

## 2.2. Sequenzierung

### 2.2.1. DNA-Isolation aus humanem Ursprungsgewebe

Bei der Isolierung genomischer DNA aus Geweben ist der essenziellste Schritt der proteolytische Abbau der Zellproteine durch ProteinaseK. Einfache Phenolextraktion der DNA zur Abtrennung sämtlicher Proteine würde in diesem Fall nicht ausreichen. Zudem ist die genomische DNA sehr komplex mit Histonen oder histonähnlichen Proteinen verpackt, deren Struktur durch Phenolisierung nicht vollständig aufgebrochen werden kann (54).

Da ein vollständiger Proteinase-Verdau des Gewebes als entscheidend für die DNA-Ausbeute gesehen wird, wurde der Proteinase-Verdau solange durchgeführt bis die Lösung klar war. Erschien sie noch trübe, wurde die Inkubation unter ProteinaseK-Zugabe um einen weiteren Tag verlängert. Um eine möglichst hohe Ausbeute an hochmolekularer DNA zu erhalten und eine unnötige Scherung der DNA zu vermeiden, wurde der gesamte Extraktionsprozess so schonend wie möglich durchgeführt.

#### Laborprotokoll: DNA-Extraktion aus Gewebe mit QIAamp DNA Mini Kit

- je nach Größe der Gewebstücke 1 bis 4 Schnitte à 10µm in ein 2ml Reaktionsgefäß geben
- 1200µl Xylol zum Entparaffinieren auf die Schnitte pipettieren, vortexen und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen, dann 5 Minuten bei 13200 U/min zentrifugieren, den Überstand vorsichtig in ein geeignetes Abfallgefäß pipettieren (Xylol ist gesundheitsschädlich und muss gesondert entsorgt werden)
- diesen Schritt wiederholen
- 1200µl EtOH zu dem Pellet pipettieren, vortexen und 5 Minuten bei 13200 U/min zentrifugieren, Überstand vorsichtig in ein geeignetes Abfallgefäß pipettieren (Xylolreste)
- diesen Schritt wiederholen
- Pellet mit geöffnetem Deckel 15 Minuten bei 37°C trocknen
- Pellet in 180µl ATL-Puffer resuspendieren und 20µl ProteinaseK dazugeben, vortexen und 1-3 Stunden bei 56°C inkubieren (alle 20 Minuten vortexen) oder über Nacht inkubieren
- kurz zentrifugieren, 200µl AL-Puffer dazugeben, 15 Sekunden pulse-vortexen und 10 Minuten bei 70°C inkubieren
- kurz zentrifugieren, 200µl EtOH dazugeben, pulse-vortexen und wieder kurz zentrifugieren
- alles auf einen QIAamp Filter pipettieren und 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugieren

- Filter in ein neues Reaktionsgefäß setzen, 500µl AW1-Puffer auf den Filter geben und 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugieren
- Filter wieder in ein neues Reaktionsgefäß setzen, 500µl AW2-Puffer auf den Filter geben und 3 Minuten bei 13200 U/min zentrifugieren
- Flüssigkeit verwerfen und den Filter 1 Minute bei 13200 U/min trocken zentrifugieren
- Filter in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß setzen, 200µl AE-Puffer auf den Filter geben, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugieren
- DNA mittels Nano Drop messen und evtl. den vorherigen Schritt wiederholen
- DNA kurzfristig bei 4°C lagern, ansonsten bei -20°C lagern

QIAamp: QIAGEN Catalog no.51304 (50)

Xylol: z.B. 2,51 Fa Sds 0750021

EtOH: z.B. 2,51 Ethanol Fa. J.T.Baker 8006

### 2.2.2. Polymerase Chain Reaction und Primersets

Die Polymerase Chain Reaction, kurz PCR genannt, ist eines der etabliertesten Verfahren zur Vervielfältigung von DNA. Dieses Verfahren findet seit seinen Anfängen im Jahre 1985 eine große Anwendungsbreite mit ständiger Weiterentwicklung in der modernen Molekularbiologie. Das einfache Prinzip ermöglicht eine rasche und effiziente Vervielfältigung der DNA, welche dann zu Forschungs- und Diagnostischen-Zwecken genutzt werden kann. Die Vorgänge bei der Vervielfältigung einer Nukleinsäure mittels PCR ähneln dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen, einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize, der Template-DNA. Bei der PCR werden als Starter-Moleküle synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an die Template-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird.

Das Grundprinzip beinhaltet somit drei sich immer wiederholende Schritte:

### 1. Denaturierungsschritt

Im Denaturierungsschritt erfolgt die Trennung des DNA-Doppelstrangs in zwei Einzelstränge, welches bereits bei einer Temperatur von 70°C beginnt und auf eine Temperatur von 94°C gesteigert wird. Einerseits leiden unter den hohen Temperaturen alle Komponenten, die Polymerase denaturiert, die Nukleotide zerfallen und DNA sowie Primer werden depuriniert. Andererseits muss auf Grund der komplexen hochmolekularen Struktur der DNA die Temperatur so hoch gefahren werden, damit auch bei Guanin und Cytosin reichen DNA-Fragmenten eine Denaturierung erfolgen kann. Deshalb hält man diese Phase so kurz wie möglich, aber so lang wie nötig.

### 2. Annealingschritt

Nun erfolgt die Primer-Hybridisierung an die einzelsträngige DNA. Dazu muss der Reaktionsansatz auf eine durch den Primer festgelegte Temperatur abgekühlt werden. Die Anlagerung des Primers an den Einzelstrang der Zielsequenz bestimmt entscheidend die Spezifität der PCR.

### 3. Elongationsschritt

Jetzt wird die Temperatur auf 72°C erhöht. Diese Temperatur stellt ein Aktivitätsoptimum des verwendeten Enzyms der Taq-DNA-Polymerase dar. Diese hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* wird verwendet, da sie die kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne Enzymzugabe erlaubt. Sie gewährleistet somit die schnelle Bindung der Oligonukleotide an den komplementären DNA-Strang. Die Elongationszeit sollte an die Länge des zu erwartenden Produkts angepasst sein. Ist die Zeit zu kurz, kann die Polymerase die Verknüpfung nicht beenden, genauso führt eine zu lange Zeit zu unerwünschten Ergebnissen. Üblicherweise rechnet man mit einer halben bis einer Minute je kb Länge, wenn man Taq-Polymerase verwendet, rechnet man mit zwei Minuten pro kb Länge (55).

### Laborprotokoll: PCR

- die Konzentration der durch die Extraktion gewonnenen DNA, wird zunächst im Nano Drop gemessen (Werte siehe Tabelle 8)
- um gleiche Konzentrationen der Ausgangs-DNA zu schaffen, werden alle Lösungen auf einen DNA-Gehalt von 20ng/μl eingestellt
- für eine optimale Ausbeute wird ein DNA-Einsatz von 60ng/μl gewählt
- die Ansätze beinhalten folgende Komponenten HPLC-Wasser, Puffer (MgCl<sub>2</sub>), 2pmol dNTP's, Primermix forward/reverse 2,5pmol (Primersets siehe Tabelle 5) und Taq-Polymerase (Ampli Taq Gold with Gene Amp)

Die folgenden Angaben gelten für 25μl Ansätze (3μl extrahierte DNA-Lösung + 22μl Mastermix). Der Mastermix setzt sich, wie aus folgender Tabelle 3 zu ersehen ist, zusammen.

Mastermix	5x	6x	9x	12x	15x	18x	21x	24x	27x	30x	34x	37x
H <sub>2</sub> O für 3μl DNA	81.5	98	147	196	245	93.5	342	391	439	489	554	603
10x Taq-Puffer	12.5	15	22.5	30	37.5	45	52.5	60	67.5	75	85	92.5
2mM dNTP's	10	12	18	24	30	36	42	48	54	60	68	74
Primermix	5	6	9	12	15	18	21	24	27	30	34	37
Taq-Polymerase	1	1.2	1.8	2.4	3	3.6	4.2	4.8	5.4	6	6.8	7.4

**Tab. 3:** Ansatzreihe für verwendete PCR-Ansätze

- die Gesamtmenge der einzelnen zu pipettierenden Lösungen ergibt sich aus der Anzahl durchgeführter PCR-Reaktionen
- den Mastermix kurz vortexen, jeweils 22μl Mastermix in sterile Tubes vorgeben
- jeweils 3μl DNA-Lösung zupipettieren, die Röhrchen verschließen und in das PCR-Gerät stellen
- die Ansätze mit dem Programm der nachfolgenden Tabelle 4 fahren lassen

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Aktivierung der Taq	10min	94°C
2. Denaturierung	15sec	94°C
3. Annealing	10sec	jeweilige Primertemperatur (s. unten)
4. Elongation	20sec	72°C
5. Schlussreaktion	3min	72°C
6. Durchlauf Ende (hold)	hold	4°C

ein Zyklus beinhaltet die Schritte 2. , 3. und 4.			
Gen	Exon	Annealing-Temp.	Zyklen
p53	5	58°C	60
	6	58°C	60
	7	58°C	60
	8	58°C	60
KRAS	2	53°C	60
	3	52°C	60
HRAS	2	61°C	60
	3	61°C	60

**Tab. 4:** PCR-Programme

Verwendetes PCR-Gerät:

Bio Rad PTC-100

Modell: PTC-1196 rev: FA

Rating: 100-240 VAC 50-60 Hz 350 Watt

Fuses: 4.50A Momantary (2) 4.OA 250V

Bei den Primern sollten folgende Parameter beachtet werden: Schmelztemperatur, 3'-Enden, Nukleotidzusammensetzung und -verteilung und Primer/Primerwechselwirkung. Die Primer sollten weder stabile Sekundärstrukturen noch Dimere bilden können. Deshalb sollten Komplementaritäten innerhalb eines Primers und zwischen den Primern vermieden werden. Sie sollten dieselbe Schmelztemperatur besitzen. Für die sequenzspezifische Hybridisierung der Primer an die Template-DNA muss eine geeignete Temperatur, die Annealing-Temperatur, gewählt werden. Als Schmelztemperatur wird dabei diejenige Temperatur bezeichnet, bei der die betrachteten DNA-Moleküle zu 50% denaturiert sind, also einzelsträngig vorliegen. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) eines DNA-Doppelstrangs bis zu einer Größe von etwa 25bp kann annäherungsweise anhand der Zusammensetzung aus GC- und AT-Paaren berechnet werden. Der Beitrag eines GC-Paares zur Schmelztemperatur beträgt etwa 4°C, der eines AT-Paares 2°C. Vereinfachte Formel zur Berechnung von  $T_m$ :  $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$ . (56)

Exon	Bezeichnung	Sequenz ( 5`->3` )	Annealing-Temperatur
p53 5	forward	CAC TTG TGC CCT GAC TTT CAA C	58°C
p53 5	reverse	CAA CCA GCC CTG TCG TCT CTC	58°C
p53 6	forward	TCC CCA GGC CTC TGA TTC CT	58°C
p53 6	reverse	CCT TAA CCC CTC CTC CCA GA	58°C
p53 7	forward	GCC TCA TCT TGG GCC TGT GTT ATC	58°C
p53 7	reverse	TCA GAG GCA AGC AGA GGC TG	58°C
p53 8	forward	CTG ATT TCC TTA CTG CCT CTT GC	58°C
p53 8	reverse	TCT CCT CCA CCG CTT CTT GTC	58°C
HRAS 2	forward	TTG GCA GGT GGG GCA GGA GA	61°C
HRAS 2	reverse	AGC AGC TGC TGG CAC CTG GA	61°C
HRAS 3	forward	TGA GCC CTG TCC TCC TGC AG	61°C
HRAS 3	reverse	TCC TGC AGG ATT CCT ACC GG	61°C
KRAS 2	forward	TAA CCT TAT GTG TGA CAT GTT CT	53°C
KRAS 2	reverse	GTC CTG CAC CAG TAA TAT GC	53°C
KRAS 3	forward	ATA ATC CAG ACT GTG TTT CTC CC	52°C
KRAS 3	reverse	TAA ACC CAC CTA TAA TGG TG	52°C

Tab. 5: Verwendete PCR-Primer

### 2.2.3. Gelelektrophorese als Nachweis der PCR-Produkte

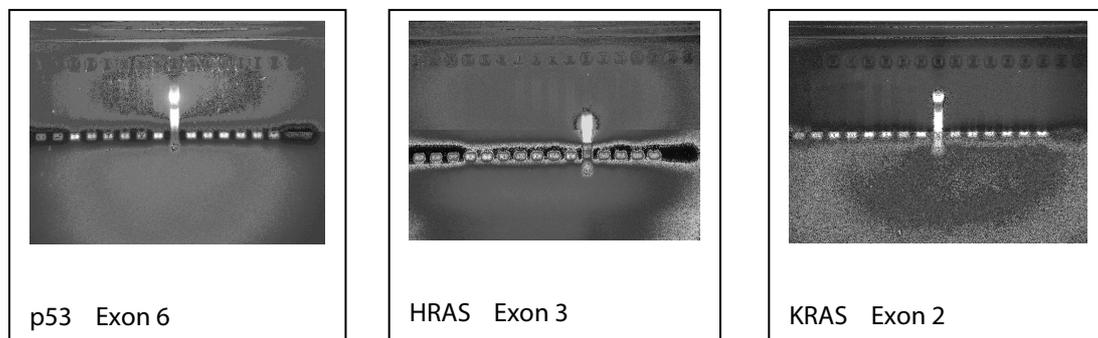
Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese. Dies ist ein einfaches und effizientes Verfahren, welches es ermöglicht, visuell zu überprüfen, ob die zuvor gelaufene PCR erfolgreich war. Mit ihr ermittelt man, ob überhaupt das gewünschte DNA-Fragment vervielfältigt wurde und vor allem in welcher Menge es vorliegt, so dass im weiteren Verlauf bei der ersten Fällung gleiche Mengen an PCR-Produkt eingesetzt werden können. Durch das Auftragen eines Markers lässt sich zudem die Länge des Fragments abschätzen und damit auch eingrenzen, ob es sich wirklich um das gewünschte Fragment handelt. Zuletzt dient es vor allem in der Diagnostik dazu, verschieden lange Fragmente voneinander zu trennen und zu identifizieren.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass das PCR-Produkt, welches in eine Tasche des Agarosegels pipettiert wird, entsprechend seiner Länge durch Anlegen einer Spannung aufgetrennt wird. Die Detektion wird ermöglicht durch das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid, denn dieses interkaliert zwischen den Basen der Nukleinsäuren. Nach Anregung durch UV-Licht erscheint der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex im sichtbaren Bereich als Bande. Auf Grund

seiner interkalierenden Eigenschaften ist dieser Farbstoff ein starkes Mutagen und entsprechende Vorsichtsmaßnahmen sind im Umgang bzw. bei der Entsorgung benutzter Gele zu treffen.

### Laborprotokoll: Gelelektrophorese

- es werden 7µl pro PCR-Ansatz mit 1µl Loadingpuffer (Set Promega 50bp) gemischt und mittels Gelelektrophorese (1,6%-iges Agarosegel in 1xTAE-Puffer) analysiert
- die Herstellung des Gels erfolgt, indem man 1,6g Agarosepulver zusammen mit 100ml 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle aufkochen lässt
- anschließend werden 3µl Ethidiumbromid zugegeben und das flüssige Gel in ein „Gel-Tray“ gegossen und ein Kamm platziert
- nach der Aushärtung wird der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt
- die mit Loadingpuffer gemischten PCR-Proben werden in die Geltaschen pipettiert, sowie auch der DNA-Längenmarker (Promega 50bp)
- die Elektrophorese läuft 25 Minuten bei 110Volt
- die anschließende Analyse erfolgt mittels des Computerprogramms DC/Devision G (Decon Science Tec GmbH). Das Bild wird ausgedruckt und dem Protokoll beigelegt



**Abb. 11: 3 Beispiele für PCR-Produkt-Analyse mit einem Elektrophorese-Gel für p53, HRAS und KRAS**

### 2.2.4. Ethanolpräzipitation der Nukleinsäuren

Die Ethanolpräzipitation ist die gebräuchlichste Methode zur Aufreinigung und Konzentrierung der DNA. In Gegenwart monovalenter Kationen bildet die DNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert wird. Die monovalenten Kationen werden durch das Natriumacetat bereitgestellt.

### Laborprotokoll: 1.Alkoholfällung

- in ein 1,5ml Reaktionsgefäß werden 17,5µl 3M Natriumacetat (NaAC) pH 5,5 gegeben
- hierzu werden 180µl HPLC-Wasser zupipettiert
- nun wird entsprechend der Stärke der Banden auf dem Agarosegel 2µl und bei schwachen Banden bis zu 5µl des PCR-Produkts hinzugegeben
- anschließend wird 500µl 2,5x100% Ethanol dazu pipettiert
- das Gesamtvolumen von 700µl wird mittels Vortexen und einmal überkopfhalten gemischt
- danach bei 14000 U/min bei 4°C 20 Minuten zentrifugieren
- den Überstand absaugen (Vakuumpumpe)
- bei geöffnetem Tube das DNA-Pellet unter dem Abzug trocknen lassen

### 2.2.5. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger et. al. (1977) wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet. Es handelt sich um eine enzymatische Methode, bei der die zu analysierende DNA als Matrize für die Synthese neuer DNA-Fragmente mit Hilfe einer DNA-Polymerase dient. Die DNA wird zuerst in eine einzelsträngige Form überführt. Diese Matrizen-DNA wird mit einem Oligonukleotid, dem Sequenzierprimer, hybridisiert. Ausgehend von diesem Primer erfolgt die Synthese des zur Matrize komplementären Strangs. Abhängig von den an das System gestellten Anforderungen (Schnelligkeit, Sensitivität, Genauigkeit, Thermostabilität) können dabei verschiedene, speziell für die DNA-Sequenzierung optimierte DNA-Polymerasen eingesetzt werden.

Das Prinzip der Sequenzierreaktion ist in jedem Fall identisch. Die DNA-Synthese wird parallel in vier Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt. Jedes Gefäß enthält Matrizen-DNA, Primer, Enzym, alle vier 2'-Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP's) und zusätzlich jeweils ein 2', 3'-Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP's: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). In jedem der vier Reaktionsgefäße laufen nun gleichzeitig zahlreiche Primerverlängerungen ab. Das Enzym akzeptiert dabei sowohl die dNTP's als auch das jeweilige ddNTP als Substrat zur Kettenverlängerung. Wird ein ddNTP eingebaut, stoppt die Reaktion danach (Kettenabbruch), da auf Grund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann.

Man erhält damit in jedem der vier Reaktionsansätze eine Mischung an DNA-Fragmenten unterschiedlicher Kettenlängen. Das 5'-Ende eines jeden Fragments wird vom Sequenzierprimer gebildet, während das 3'-Ende aus dem für jeden Reaktionsansatz spezifischen Didesoxynukleotid besteht. Zur späteren Analyse wird jeder neusynthetisierte DNA-Strang entweder radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Da mittlerweile Reagenzien zur Verfügung stehen, die es erlauben, jedes der vier ddNTP's mit einem unterschiedlichen Fluorophor markiert in die Synthese einzusetzen, kann die Sequenzierreaktion auch in einer Eintopfreaktion durchgeführt und das Reaktionsprodukt nach Auftrennen in nur einer Gelspur mit einem auf die vier Farbstoffe adaptierten laseroptischen System detektiert werden.

### 2.2.6. Cycle-Sequencing

Die Anwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen ermöglicht in der DNA-Sequenzierung, analog zur PCR, die gleichzeitige Amplifikation und Sequenzierung. Dieses Verfahren wird Cycle-Sequencing genannt. Im Gegensatz zur PCR befindet sich in der Reaktion nur ein Primer, es wird also lediglich linear und nicht exponentiell amplifiziert. In einer Mischung aus DNA-Matrizen, Primer thermostabiler Polymerase und einem dNTP/ddNTP-Gemisch wird ein thermisches Profil, bestehend aus Primerdenaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese, etwa 30 mal durchlaufen, quasi eine Sequenzierungsreaktion 30 mal wiederholt. Entsprechend groß ist die Menge der produzierten Sequenzierungsfragmente (54).

#### Laborprotokoll: Cycle-Sequencing (Big Dye Terminator V 1.1 Cycle Sequencing Kit)

- die Reaktionsgefäße mit den getrockneten Pellets mit 11 µl HPLC-Wasser versetzen
- dazu gibt man zu den entsprechenden Tubes (forward oder reverse) 1 µl des zugehörigen Primers
- auf niedriger Stufe vortexen, damit sich das Pellet löst
- in die vorbereiteten Stripes 6 µl Puffer und 2 µl Big Dye hinzu pipettieren
- aus den gevortexten Reaktionsgefäßen wird nun das Gesamtvolumen von 12 µl nach gründlichem Mischen in die Stripes überpipettiert
- die Stripes gibt man in den Thermocycler und startet das Cycle-Sequencing-Programm
- die leeren Reaktionsgefäße werden aufbewahrt

Danach erfolgt noch einmal eine Aufreinigung der DNA, diese entspricht der 1. Alkoholfällung siehe 2.2.4 Ethanolpräzipitation der Nukleinsäuren.

### Laborprotokoll: 2. Alkoholfällung

- in das aufbewahrte Reaktionsgefäß werden 10µl 3M Natriumacetat (NaAC) gegeben
- hierzu werden 70µl HPLC-Wasser zupipettiert
- nun wird der Cycle-sequencing-Ansatz von 20µl in das Reaktionsgefäß überpipettiert
- anschließend wird 250µl 2,5xEthanol dazu pipettiert
- das Gesamtvolumen von 350µl wird mittels Vortexen und einmal überkopfhalten gemischt
- danach bei 14000 U/min bei 4°C 20 Minuten zentrifugieren
- den Überstand absaugen (Vakuumpumpe)
- bei geöffnetem Tube das DNA-Pellet unter dem Abzug trocknen lassen

### 2.2.7. Detektion der Sequenz

Die Detektion von Fluorophor-markierten DNA-Fragmenten erfolgt direkt im Gel nach Aktivierung mit einem Laser innerhalb einer Kapillare. Die detektierten Signale werden computerunterstützt direkt in die Sequenz umgewandelt. Die Vorteile bei Verwendung einer Kapillare sind eine bessere Automatisierbarkeit, ein kleineres Probenvolumen und geringere Kosten pro Probenlauf. Hinzu kommt, dass bei der Elektrophorese auf Grund des hohen Oberflächen- zu Volumenverhältnisses die entstehende Wärme viel besser abgeleitet wird. Daher können höhere Feldstärken verwendet werden, was die Elektrophorese verkürzt. Während bei der Elektrophorese im flachen Gel bei Laufzeiten zwischen 6 und 18 Stunden im Schnitt zwischen 60 und 1200 Nukleotide gelesen werden können, kommt man mit der Kapillare bei Laufzeiten von ein bis vier Stunden auf Leselängen von 500 bis 900 Nukleotiden. Der Nachteil, dass in einer Kapillare nur eine Probe bzw. ein Reaktionsansatz aufgetrennt werden kann, wird dadurch ausgeglichen, das Kapillarbündel mit acht bis maximal 6x64 Kapillaren verwendet werden (in der vorliegenden Arbeit 16 Kapillaren ABI 3100).

Da das Sequenziergerät in der Lage ist, die vier verschiedenen Fluorophore gleichzeitig zu detektieren, bedeutet dieses, dass in der Sequenzierreaktion

unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen in jeder der vier Kettenabbruchreaktionen eingebracht und alle vier Ansätze anschließend in einer Spur bzw. einer Kapillare aufgetrennt werden (four-label, single-lane approach) (55).

### Laborprotokoll: Sequencing

- die aufbewahrten Reaktionsgefäße mit den getrockneten DNA-Pellets werden mit 35µl Formamid versetzt und gemischt
- dann wird das Gesamtvolumen in die Mikrotiterplatten überpipettiert
- Mikrotiterplatten in das Sequenziergerät stellen
- Sequenzieranalyse über Nacht fahren lassen

Verwendetes Sequenziergerät:

AB Applied Biosystems Hitachi  
3100 Genetic Analyzer  
ABI Prism (Serial No. 1476-016)

### 2.2.8. Auswertung der Sequenzen

Alle Sequenzen wurden ausgedruckt und mit einer Referenzsequenzvorlage verglichen. Die Sequenzvorlagen wurden aus einer öffentlichen Datenbank (Genbank, [!!HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)) bezogen. Die entsprechenden Referenzsequenz-Identifikationsnummern sind in Tabelle 6 gelistet.

Gen	Referenzsequenz-Identifikationsnummern
p53	P53 NM_000546
HRAS	HRAS NM_005343
KRAS	KRAS NM_004985

**Tab. 6:** Referenzsequenz-Identifikationsnummern

Die Mutationsanalyse pro Zelllinie wurde an zwei separat angesetzten PCR-Reaktionen durchgeführt. Um eventuell auftretende Artefakte, wie z.B. falsche von der Taq-Polymerase verursachte Mutationen zu identifizieren, wird pro Exon die erste Probe vorwärts, die zweite Probe rückwärts sequenziert.

### Als nicht mutiert wird gewertet, wenn:

- beide Exonsequenzen der Sequenzvorlage entsprechen.
- nur eine Sequenz analysierbar ist und keine Mutation zeigt.
- eine Sequenz mutiert ist, jedoch keine Mutation in der anderen Sequenz auftritt (entspricht Artefakt).

### Als mutiert wird gewertet, wenn:

- beide Exonsequenzen an derselben Stelle die selbe Mutation aufweisen.
- als homozygote Mutation wird gewertet, wenn nur ein Peak auf gleicher Höhe wie die umliegenden Peaks vorliegt und klar die ausgetauschte Base zu erkennen ist.
- als heterozygote Mutation wird gewertet, wenn zwei gleichhohe Peaks vorliegen, die aber insgesamt nur die halbe Höhe der umliegenden Peaks erreichen.

Anhand der Codontabelle (siehe Tabelle 7) wurde dann der Aminosäurenaustausch ermittelt.

		Zweite Position des Codons												
		T			C			A			G			
Erste Position des Codons	T	TTT	Phe	[F]	TCT	Ser	[S]	TAT	Tyr	[Y]	TGT	Cys	[C]	T
		TTC	Phe	[F]	TCC	Ser	[S]	TAC	Tyr	[Y]	TGC	Cys	[C]	C
		TTA	Leu	[L]	TCA	Ser	[S]	TAA	Ter	[end]	TGA	Ter	[end]	A
		TTG	Leu	[L]	TCG	Ser	[S]	TAG	Ter	[end]	TGG	Trp	[W]	G
	C	CTT	Leu	[L]	CCT	Pro	[P]	CAT	His	[H]	CGT	Arg	[R]	T
		CTC	Leu	[L]	CCC	Pro	[P]	CAC	His	[H]	CGC	Arg	[R]	C
		CTA	Leu	[L]	CCA	Pro	[P]	CAA	Gln	[Q]	CGA	Arg	[R]	A
		CTG	Leu	[L]	CCG	Pro	[P]	CAG	Gln	[Q]	CGG	Arg	[R]	G
	A	ATT	Ile	[I]	ACT	Thr	[T]	AAT	Asn	[N]	AGT	Ser	[S]	T
		ATC	Ile	[I]	ACC	Thr	[T]	AAC	Asn	[N]	AGC	Ser	[S]	C
		ATA	Ile	[I]	ACA	Thr	[T]	AAA	Lys	[K]	AGA	Arg	[R]	A
		ATG	Met	[M]	ACG	Thr	[T]	AAG	Lys	[K]	AGG	Arg	[R]	G
	G	GTT	Val	[V]	GCT	Ala	[A]	GAT	Asp	[D]	GGT	Gly	[G]	T
		GTC	Val	[V]	GCC	Ala	[A]	GAC	Asp	[D]	GGC	Gly	[G]	C
		GTA	Val	[V]	GCA	Ala	[A]	GAA	Glu	[E]	GGA	Gly	[G]	A
		GTG	Val	[V]	GCG	Ala	[A]	GAG	Glu	[E]	GGG	Gly	[G]	G

Tab. 7: Codontabelle zur Darstellung der zugehörigen Aminosäuren

### Als nicht analysierbar gilt, wenn:

- trotz eingeleiteter Maßnahmen kein PCR-Produkt erhalten wird.
- keine Sequenz erhalten wird.

### Die Sequenzierung wird wiederholt, wenn:

- trotz ausreichender PCR-Produktmenge keine Sequenz erhalten wird.
- eine Mutation in einem PCR-Produkt auftritt, bei dem zweiten PCR-Produkt keine Sequenz (trotz ausreichender Produktmenge) erhalten wird.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Mutationsanalysen

##### 3.1.1. Konzentration der Zelllinien-Extrakte

Das verwendete Zelllinien-Material wurde, wie bereits beschrieben, durch Extraktion aus dem Ursprungsgewebe gewonnen. Für die Erstellung eines aussagekräftigen Mutationsstatus ist es von großer Bedeutung, Zelllinien mit einem hohen Reinheitsgrad und einer ausreichend hohen DNA-Konzentration auszuwählen. Qualitativ hochwertige DNA, die zur Sequenzierung geeignet war, konnte in der vorliegenden Arbeit aus 56 Zelllinien gewonnen werden. Die Konzentrationen der extrahierten DNA variierten je nach Zelllinie. Die DNA-Konzentrationen der verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Organ	Zelllinien	Datum	DNA ng/ul	ratio
Kolon	DLD-1	01.02.2006	572,6	1,99
Kolon	COLO 320DM	26.01.2006	146,6	1,90
Kolon	HCT-8	14.02.2006	745,5	2,01
Kolon	COLO 201	27.01.2006	683,8	1,90
Kolon	SK-CO-1	12.03.2006	384,7	1,99
Kolon	SW-620	28.06.2006	524,1	2,00
Kolon	HAT 29	14.05.2006	692,2	2,03
Kolon	HCT-15	22.12.2005	380,2	2,06
Kolon	COLO 205	18.03.2006	33,3	1,92
Kolon	HCT-116	27.04.2006	400,4	1,99
Leber	HEP G2	28.04.2006	92,1	1,98
Ovar	OVCAR-3	09.12.2005	418,5	2,05
Ovar	OVCAR-4	20.12.2005	59,5	1,93
Ovar	OVCAR-5	15.12.2005	77,4	2,07
Ovar	OVCAR-8	25.11.2005	140,8	1,99
Ovar	OC-2	08.12.2005	107,9	2,03
Knochenmark	K562	12.01.2006	114,2	2,02
Knochenmark	HL-60 (TB)	16.02.2006	262	1,98
Haut	SK-MEL-28	15.07.2006	6,4	2,29
Haut	MEL-HO	09.05.2006	65,9	2,02
Haut	IGR-1	25.05.2006	52,3	1,82
Haut	A 431	28.06.2006	47,3	1,98
Haut	HACAT	25.05.2006	32,9	2,04
Haut	A375	03.05.2006	64	2,06

Organ	Zelllinien	Datum	DNA ng/ul	ratio
Brust	ZR-75-1	07.06.2006	40,9	2,11
Brust	HBL-100	02.03.2006	258,2	2,03
Brust	BT 549	06.05.2006	12,3	2,00
Brust	HS-578T	05.04.2006	33,4	2,23
Brust	MCF-7	05.04.2006	259,9	2,03
Brust	MDA-MB 435	04.05.2006	178,5	1,99
Brust	MDA-NEO	26.04.2006	483,2	2,08
Lunge	NCI-H23	04.03.2006	155,8	1,92
Lunge	NCI-H322M	04.03.2006	398,3	2,03
Lunge	NCI-H522	13.04.2006	48,1	2,01
Niere	CAKI-2	13.07.2006	39,3	2,05
Niere	293	06.04.2006	972,6	2,18
Niere	786-0	11.05.2006	10,4	2,24
Gehirn	T98G	28.04.2006	49,5	1,94
Gehirn	SNB-19	28.06.2006	20,7	1,99
Gehirn	GaMG	28.06.2006	48,7	2,18
Gehirn	DBTRG-05MG	18.05.2006	106,7	1,99
Gehirn	U-343MG	12.07.2006	18,4	2,04
Gehirn	172	21.07.2006	7,5	1,75
Knochen	SAOS-2	09.07.2006	36,6	1,92
Harnwege	ECV 304	12.04.2006	138,7	2,06
Harnwege	J-82	08.06.2006	62,6	2,00
Harnwege	SCABER	15.07.2006	34,3	1,94
Harnwege	5637	03.02.2006	103,6	1,98
Harnwege	TCC-SUP	27.04.2006	23,1	1,88
Harnwege	RT-112	26.05.2006	152,8	2,01
Gebärmutter	HELA	15.02.2006	56,4	2,06
Schilddrüse	ONCO-DG-I	13.07.2006	18,5	1,97
Schilddrüse	CAL-62	12.04.2006	100,6	2,06
Schilddrüse	ML-1	24.06.2006	40,5	1,97
Schilddrüse	B-CPAP	10.04.2006	243,6	2,02
Schilddrüse	8505C	01.06.2005	71,8	2,01

Tab. 8: DNA-Konzentrationen der Zelllinien-Extrakte

### 3.1.2. Zusammenstellung der p53-Analyse

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die 56 Zelllinien, die auf p53-Mutationen geprüft wurden. Untersucht wurden vier Exons von p53, und zwar Exon5, 6, 7 und 8.

Es wurden insgesamt bei 56 Zelllinien neun Mutationen in Exon5, eine Mutation in Exon6, zehn Mutationen in Exon7 und 13 Mutationen in Exon8 festgestellt, siehe für genaue Angaben zu Gewebetyp und Ort der jeweiligen Mutation Tabelle 9.

## Ergebnisse

Organ	Zelllinien	p53 Exon5	p53 Exon6	p53 Exon7	p53 Exon8
Kolon	DLD-I	x	x	S 241 F het	x
Kolon	COLO 320 DM	x	x	R 248 W hom	x
Kolon	HCT-8	x	x	x	x
Kolon	COLO 201	x	x	x	x
Kolon	SK-CO-1	x	x	x	x
Kolon	SW-620	x	x	x	R 273 H hom
Kolon	HAT 29	x	x	x	R 273 H hom
Kolon	HCT-15	x	x	S 241 F het	x
Kolon	COLO 205	x	x	M 246 I hom	x
Kolon	HCT-116	x	x	x	x
Leber	HEP G2	x	x	x	x
Ovar	OVCAR-3	x	x	x	x
Ovar	OVCAR-4	L 130 V hom	x	x	T 284 P het
Ovar	OVCAR-5	x	x	x	x
Ovar	OVCAR-8	x	x	x	x
Ovar	OC-2	x	x	x	x
Knochenmark	K-562	136 Insertion	x	x	x
Knochenmark	HL-60 (TB)	x	x	x	x
Haut	SK-MEL-28	L 145 R hom	x	x	x
Haut	MEL-HO	x	x	x	x
Haut	IGR-1	x	x	x	x
Haut	A 431	x	x	x	R 273 H hom
Haut	HACAT	H 179 Y het	x	x	R 282 W het / D 281 het
Haut	A-375	x	x	x	x
Brust	ZR-75-I	x	x	x	x
Brust	HBL-100	x	x	x	x
Brust	BT 549	x	x	R 249 S hom	x
Brust	HS-578T	V 157 F hom	x	x	x
Brust	MCF 7	x	x	x	x
Brust	MDA-MB-435	x	x	x	G 266 E het
Brust	MDA-NEO	x	x	x	R 273 H hom
Lunge	NCI-H23	x	x	x	x
Lunge	NCI-H322M	x	x	R 248 L hom	x
Lunge	NCI-H522	x	191 Deletion	x	x
Niere	CAKI-2	x	x	x	x
Niere	293	x	x	x	x
Niere	786-0	x	x	x	P 278 A het

Organ	Zelllinien	p53 Exon5	p53 Exon6	p53 Exon7	p53 Exon8
Gehirn	T98G	x	x	x	R 273 H het
Gehirn	SNB-19	x	x	x	R 273 H hom
Gehirn	GaMG	x	x	x	L 265 P hom
Gehirn	DBTRG-05MG	x	x	x	x
Gehirn	U-343MG	x	x	x	x
Gehirn	172	R 175 H hom	x	x	x
Knochen	SAOS-2	x	x	M 246 I hom	x
Harnwege	ECV 304	Y 126 end hom	x	x	x
Harnwege	J-82	x	x	x	E 271 K hom
Harnwege	SCABER	x	x	x	x
Harnwege	5637	x	x	x	R 280 T hom
Harnwege	TCC-SUP	x	x	x	x
Harnwege	RT-II2	R 158 H hom	x	x	x
Gebärmutter	HELA	x	x	x	x
Schilddrüse	ONCO-DG-I	x	x	R 248 Q hom	x
Schilddrüse	CAL-62	A 161 D hom	x	x	x
Schilddrüse	ML-1	x	x	x	x
Schilddrüse	B-CPAP	x	x	D 259 Y hom	x
Schilddrüse	8505C	x	x	R 248 G hom	x
Mutation		x = keine Mutation	hom = homozygot	het = heterozygot	

Tab. 9: Übersicht der gesamten Zelllinien für die p53-Untersuchung

### 3.1.3. Zusammenstellung der KRAS- und HRAS-Analyse

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die 56 Zelllinien, die auf KRAS- und HRAS-Mutationen geprüft wurden. Untersucht wurden je zwei Exons (Exon2 und 3). Es wurden insgesamt bei KRAS acht Mutationen im Exon2 und eine Mutation im Exon3 festgestellt. Bei HRAS wurden zwei Mutationen im Exon2 und keine Mutationen im Exon3 festgestellt, siehe für genaue Angaben zu Gewebetyp und Ort der jeweiligen Mutationen Tabelle 10.

## Ergebnisse

Organ	Zelllinien	KRAS Exon2	KRAS Exon3	HRAS Exon2	HRAS Exon3
Kolon	DLD-I	G 13 D het	x	x	x
Kolon	COLO320 DM	x	x	x	x
Kolon	HCT-8	G 13 D het	x	x	x
Kolon	COLO 201	x	x	x	x
Kolon	SK-CO-1	x	x	x	x
Kolon	SW-620	G 12 V hom	x	x	x
Kolon	HT 29	x	x	x	x
Kolon	HCT-15	G 13 D het	x	x	x
Kolon	COLO 205	G 12 C het	x	x	x
Kolon	HCT-116	G 13 D het	x	x	x
Leber	HEP G2	x	x	x	x
Ovar	OVCAR-3	x	x	x	x
Ovar	OVCAR-4	x	x	x	x
Ovar	OVCAR-5	G 12 V hom	x	x	x
Ovar	OVCAR-8	x	x	x	x
Ovar	OC-2	x	x	x	x
Knochenmark	K-562	x	x	x	x
Knochenmark	HL-60 (TB)	x	Q 61 H hom	x	x
Haut	SK-MEL-28	x	x	x	x
Haut	MEL-HO	x	x	x	x
Haut	IGR-1	x	x	x	x
Haut	A 431	x	x	x	x
Haut	HACAT	x	x	x	x
Haut	A-375	x	x	x	x
Brust	ZR-75-I	x	x	x	x
Brust	HBL-100	x	x	x	x
Brust	BT 549	x	x	x	x
Brust	HS-578T	x	x	G 12 D het	x
Brust	MCF 7	x	x	x	x
Brust	MDA-MB-435	x	x	x	x
Brust	MDA-NEO	x	x	x	x
Lunge	NCI-H23	x	x	x	x
Lunge	NCI-H322M	x	x	x	x
Lunge	NCI-H522	x	x	x	x
Niere	CAKI-2	x	x	x	x
Niere	293	x	x	x	x
Niere	786-0	x	x	x	x

Organ	Zelllinien	KRAS Exon2	KRAS Exon3	HRAS Exon2	HRAS Exon3
Gehirn	T98G	x	x	x	x
Gehirn	SNB-19	x	x	x	x
Gehirn	GaMG	x	x	x	x
Gehirn	DBTRG-05MG	x	x	x	x
Gehirn	U-343MG	x	x	x	x
Gehirn	172	x	x	x	x
Knochen	SAOS-2	x	x	x	x
Harnwege	ECV 304	x	x	G 12 V het	x
Harnwege	J-82	x	x	x	x
Harnwege	SCABER	x	x	x	x
Harnwege	5637	x	x	x	x
Harnwege	TCC-SUP	x	x	x	x
Harnwege	RT-II2	x	x	x	x
Gebärmutter	HELA	x	x	x	x
Schilddrüse	ONCO-DG-I	x	x	x	x
Schilddrüse	CAL-62	G 12 R hom	x	x	x
Schilddrüse	ML-1	x	x	x	x
Schilddrüse	B-CPAP	x	x	x	x
Schilddrüse	8505C	x	x	x	x
Mutation		x = keine Mutation		hom = homozygot	het = heterozygot

Tab. 10: Übersicht der gesamten Zelllinie für KRAS- und HRAS-Untersuchung

### 3.1.4. Zelllinien mit p53-, KRAS- und HRAS-Mutationen

Die Tabelle 11 gibt eine komplette Übersicht über die Mutationen von p53 Exon5, 6, 7 und 8, KRAS Exon2 und 3, sowie HRAS Exon2 und 3 der in dieser Arbeit untersuchten 56 Zelllinien.

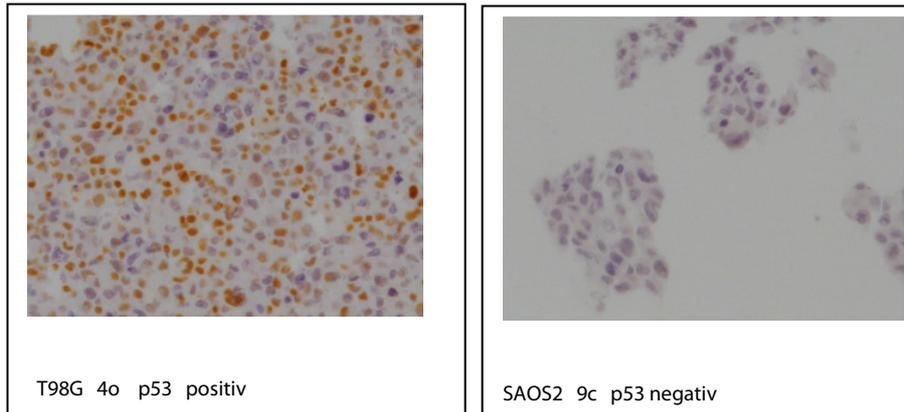
Organ	Zelllinie	p53-Mutation	KRAS-Mutation	HRAS-Mutation
Kolon	DLD-1	S 241 F het	G 13 D het	
Kolon	COLO 320DM	R 248 W hom		
Kolon	HCT-8		G 13 D het	
Kolon	SW-620	R 273 H hom	G 12 V hom	
Kolon	HT 29	R 273 H hom		
Kolon	HCT-15	S 241 F het	G 13 D het	
Kolon	COLO 205	M 246 I hom	G 12 C het	
Kolon	HCT-116		G 13 D het	
Ovar	OVCAR-4	L 130 V hom / T 284 P het		
Ovar	OVCAR-5		G 12 V hom	

Organ	Zelllinie	p53-Mutation	KRAS-Mutation	HRAS-Mutation
Knochenmark	K562	136 Insertion		
Knochenmark	HL-60 (TB)		Q 61 H hom	
Haut	SK-MEL-28	L 145 R hom		
Haut	A 431	R 273 H hom		
Haut	HACAT	H 179 Y het / R 282 W het		
Brust	BT 549	R 249 S hom		
Brust	HS-578T	V 157 F hom		G 12 D het
Brust	MDA-MB 435	G 266 E het		
Brust	MDA-NEO	R 273 H hom		
Lunge	NCI-H322M	R 248 L hom		
Lunge	NCI-H522	191 Deletion		
Niere	786-0	P 278 A het		
Gehirn	T98G	R 273 H het		
Gehirn	SNB-19	R 273 H hom		
Gehirn	GaMG	L 265 P hom		
Gehirn	172	R 175 H hom		
Knochen	SAOS-2	M 246 I hom		
Harnwege	ECV 304	Y 126 end hom		G 12 V het
Harnwege	J-82	E 271 K hom		
Harnwege	5637	R 280 T hom		
Harnwege	RT-112	R 158 H hom		
Schilddrüse	ONCO-DG-I	R 248 Q hom		
Schilddrüse	CAL-62	A 161 D hom	G 12 R hom	
Schilddrüse	B-CPAP	D 259 Y hom		
Schilddrüse	8505C (219)	R 248 G hom		

**Tab. 11:** Zusammenstellung der Zelllinien mit p53-, KRAS- und HRAS-Mutationen

### 3.1.5. Immunhistochemischer Nachweis

Von allen untersuchten Zelllinien war der immunhistochemische p53-Expressionsstatus bekannt. Ein Vergleich der IHC (Immunhistochemie) mit dem Mutationsstatus zeigte bei den aufgeführten neuen p53-Mutationen, dass die Zelllinie T98G positiv auf p53 anzeigt. Bei der Zelllinie SAOS2 ist in der Immunhistochemie p53 nicht nachweisbar.



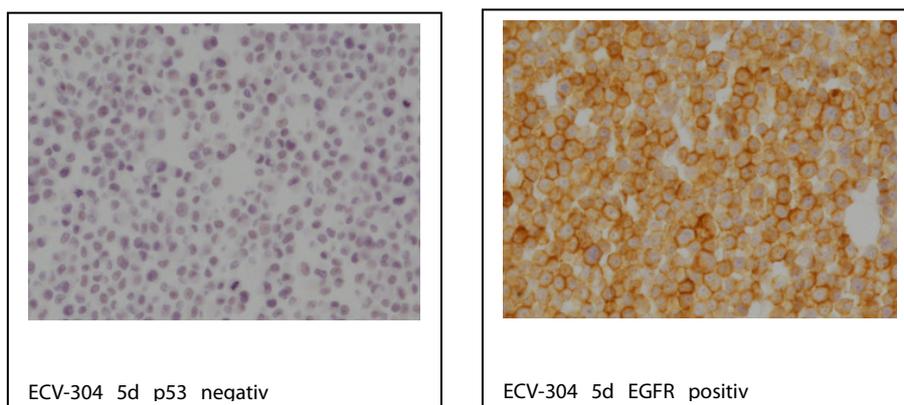
**Abb. 12: IHC von p53 an den Zelllinien T98G und SAOS2**

Bei der Zelllinie ECV-304 ist die Immunhistochemie auch negativ. Das lässt sich aber durch die Mutation begründen, die zu einem Abbruch der Aminosäurekette führt (Y126end) und somit kein p53-Protein produziert werden kann.

Zelllinie	IHC p53	p53-Mutation	Auswirkung
T98G	positiv	R273H	- Stabilisierung der Halbwertszeit
SAOS2	negativ	M246I	- kein Einfluss auf Halbwertszeit - Veränderung des Epitops des Proteins
ECV-304	negativ	Y126Stop	- Kettenabbruch

**Tab. 12: Immunhistochemie und Auswirkung**

Allerdings zeigt die Zelllinie ECV-304 sehr stark den immunhistochemischen Nachweis auf EGFR.



**Abb. 13: IHC von p53 und EGFR an der Zelllinie ECV-304**

Dieser Nachweis auf eine EGFR-Expression deckt sich mit der Mutationsanalyse, in der festgestellt wurde, dass ECV-304 eine HRAS-Mutation aufweist (G12V) und somit die Antikörperreaktion begründet.

Es konnte daher neu aufgedeckt werden, dass die Harnblasen-Zelllinie ECV-304 eine p53- (Y126end) sowie eine HRAS- (G12V) Mutation besitzt. Weitere Zelllinien mit Mutationen im p53-Gen in Kombination mit einer Mutation im RAS-Gen sind die Kolonzelllinien DLD-1, SW-620, HCT-15 und COLO 205, die Brustzelllinie HS-578T und die Schilddrüsenzelllinie CAL-62.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 56 Zelllinien von humanen Tumoren auf Mutationen von KRAS, HRAS und p53 untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass Zelllinien häufig dieselben Mutationen tragen, die auch in klinischen Tumoren vorkommen.

Insgesamt wurde in 44 Zelllinien mindestens eine Mutation gefunden. Am weitaus häufigsten waren Mutationen von p53, die in immerhin 33 Zelllinien detektiert wurden. Die hohe Häufigkeit von p53-Mutationen war auf Grund der bedeutenden Rolle von p53 für humane Tumoren zu erwarten. Da es sich bei p53 um eines der am häufigsten analysierten Gene des Menschen handelt und weil zudem ein Teil der Zelllinien zu den Standardzelllinien überhaupt gehören – nämlich zum sogenannten NCI60-Panel - war es nicht weiter verwunderlich, dass viele der gefundenen Mutationen bereits bekannt waren. Das NCI60-Panel besteht aus humanen 60 Zelllinien, die von dem National Institute of Health im Zeitraum von 1975 bis 1989 zusammengestellt wurden und sich als besonders tauglich für die Erforschung von humanen Tumoren erwiesen haben. Folglich wurde besonders intensiv an diesen Zelllinien gearbeitet. So existieren z.B. von jeder dieser Zelllinien DNA-Kopiezahlprofile und von einem Großteil der Zelllinien auch ausgedehnte molekulargenetische Daten (57) (58) (59).

Das Wiederauffinden solcher bereits bekannten Mutationen bestätigt aber zum Einen, dass die Analyse in der vorliegenden Arbeit korrekt durchgeführt worden ist und zum Anderen, dass es sich bei den von mir untersuchten Zelllinien in der Regel immer noch um die ursprüngliche Form handelt. Die Zelllinien mit bekannten Mutationen und den dazugehörigen Studien sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

<b>Tumortyp</b>	<b>Zelllinie</b>	<b>KRAS-Mutation</b>	<b>Autor</b>	<b>Quelle</b>
Kolorektalkarzinom	DLD-I	G 13 D	S. Siranoush et al.	(60)
Kolorektalkarzinom	SW-620	G 12 V	O. Ikediobi et al.	(61)
Kolorektalkarzinom	HCT-15	G 13 D	O. Ikediobi et al.	(61)
Kolorektalkarzinom	COLO 205	G 12 C	O. Ikediobi et al.	(61)
Kolorektalkarzinom	HCT-116	G 13 D	O. Ikediobi et al.	(61)
Ovar Adenokarzinom	OVCAR-5	G 12 V	O. Ikediobi et al.	(61)
Schilddrüsenkarzinom	CAL-62	G 12 R	R. Leboeuf et al.	(62)
<b>Tumortyp</b>	<b>Zelllinie</b>	<b>HRAS-Mutation</b>	<b>Autor</b>	<b>Quelle</b>
Brustdrüsenkarzinom	HS-578T	G 12 D	O. Ikediobi et al.	(61)
<b>Tumortyp</b>	<b>Zelllinie</b>	<b>p53-Mutation</b>	<b>Autor</b>	<b>Quelle</b>
Kolorektalkarzinom	DLD-1	S 241 F	T. Minamoto et al	(63)
Kolorektalkarzinom	Colo 320DM	R 248 W	T. Minamoto et al	(63)
Kolorektalkarzinom	HCT 15	S 241 F	O. Ikediobi et al	(61)
Kolorektalkarzinom	COLO 205	M 246 I	O. Ikediobi et al	(61)
Kolorektalkarzinom	SW-620	R 273 H	O. Ikediobi et al	(61)
Kolorektalkarzinom	HT 29	R 273 H	O. Ikediobi et al	(61)
Brustdrüsenkarzinom	HS-578T	V 157 F	O. Ikediobi et al	(61)
Brustdrüsenkarzinom	BT 549	R 249 S	O. Ikediobi et al	(61)
Brustdrüsenkarzinom	MDA-MB 435	G 266 E	O. Ikediobi et al	(61)
Brustdrüsenkarzinom	MDA-NEO	R 273 H	Y. Tomita et al	(64)
Harnblasenkarzinom	RT-112	R 158 H	Sanger Institue	(65)
Harnblasenkarzinom	J-82	E 271 K	S. Mizuarai et al	(66)
Harnblasenkarzinom	5637	R 280 T	E. Lopez Knowles	(67)
Schilddrüsenkarzinom	CAL 62	A 161 D	Sanger Institute	(68)
Schilddrüsenkarzinom	Onco-DG-1	R 248 Q	R. Malaguarnera	(69)
Schilddrüsenkarzinom	B-CPAP	D 259 Y	R. Malaguarnera	(69)
Schilddrüsenkarzinom	8505C (219)	R 248 G	R.Leboeuf et al	(62)
Glioblastom	172	R 175 H	M.Alonso et al	(70)
Glioblastom	GAMG	L 265 P	Sanger Institute	(71)
Glioblastom	SNB 19	R 273 H	O. Ikediobi et al	(61)
malignes Melanom	Skmel 28	L 145 R	O. Ikediobi et al	(61)
malignes Melanom	HACAT	H 179 J / R 282 W	L.Q. Jia et al	(72)
Epidermoides Karzinom	A 431	R 273 H	R. P. Wong et al	(73)
NSCLC	NCI-H522	191 Deletion	O. Ikediobi et al	(61)
NSCLC	NCI-H322M	R 248 L	O. Ikediobi et al	(61)

Tumortyp	Zelllinie	p53-Mutation	Autor	Quelle
Ovaradenokarzinom	Ovcar 4	L 130 V / T 284 P	O. Ikediobi et al	(61)
Leukämie	K562	136 Insertion	O. Ikediobi et al	(61)
Nierenadenokarzinom	786-0	P 278 A	O. Ikediobi et al	(61)

**Tab. 13:** Zelllinien mit bekannten KRAS-, HRAS- und p53-Mutation

Es wäre jedoch denkbar, dass Zelllinien, die oft ein hohes Maß an genetischer Instabilität aufweisen, sich genetisch verändern könnten. Das Risiko dafür ist wahrscheinlich besonders hoch, wenn es sich um eine Zelllinie handelt, die von Labor zu Labor weitergegeben wird und die schon eine Vielzahl von Passagen durchlaufen hat. Hinweise auf eine Veränderung ergaben sich in der vorliegenden Studie bei drei Zelllinien, in denen entweder nicht bekannte Mutationen gefunden wurden oder bekannte Mutationen nicht detektiert wurden. So wurden die Zelllinien HCT 8 und HL 60, die beide eine Mutation im KRAS-Gen zeigten, in früheren Studien von Ballin-Gauthier et al. und O. Ikediobi et al. aus dem Jahre 2006 (74) (61) oder von Benvenuti et al. aus dem Jahre 2007 (75) als Wildtyp für KRAS beschrieben. Umgekehrt konnte in dieser Studie eine vorher beschriebene KRAS-Mutation bei der Zelllinie NCI-H23 nicht bestätigt werden. Technische Ursachen für diese Diskrepanzen können ausgeschlossen werden, da die Sequenzierung für diese Zelllinien wiederholt wurde. Es ist allerdings theoretisch nicht undenkbar, dass Verwechslungen mit anderen Zelllinien bereits vor dieser Studie aufgetreten sein könnten. Es wäre interessant, die Zelllinien nochmals von der Zellkultursammlung ATCC (American Tissue Culture Collection) zu bestellen und erneut zu testen.

Unser Zelllinienkollektiv enthielt neben den NCI-60 Zelllinien auch einige weniger gebräuchliche Zelllinien. So wurde in drei Zelllinien eine p53-Mutation gefunden, für die diese Veränderung bislang nicht bekannt war. Hierbei handelt sich um die Harnblasenkarzinomzelllinie ECV 304, die Glioblastomzelllinie T98G und die Osteosarkomzelllinie SAOS 2. Die in diesen drei Zelllinien gefundenen Mutationen sind relativ häufig im p53-Gen zu finden. Eine Übersicht ist in Tabelle 14 gegeben.

Tumortyp	Zelllinie	p53-Mutation	Autor
Harnblasenkarzinom	ECV 304	Y 126 end	eigene Studie
Glioblastom	T98G	R 273 H	eigene Studie
Osteosarkom	SAOS 2	M 246 I	eigene Studie

**Tab. 14:** Zelllinien mit neuen p53-Mutationen

Zudem wurden zwei Zelllinien gefunden, die gleich zwei p53-Mutationen beinhalten. Dies waren die Zelllinie Ovar4 und HACAT, die erstere eine Ovariakarziomzelllinie, die zweite eine Melanomzelllinie. Diese zweifache Mutation ist in diesen Zelllinien bereits beschrieben worden (61) (72).

KRAS-Mutationen wurden in immerhin neun Zelllinien gefunden. Anders als beim p53, wo es keine besonderen „hot spots“, das heißt Positionen mit einer besonderen Häufung von Mutation gibt, kommen KRAS-Mutationen fast ausschließlich (99%) in den Codons 12 und 13 im Exon 2 vor. Ein dritter „hot spot“ befindet sich in Codon 61 in Exon 3 (76). Genau wie in klinischen Tumoren, wo diese Mutation in <1% der Tumoren gefunden wird, zeigte sich diese Mutation auch nur in einer einzigen Zelllinie nämlich der Lymphomzelllinie HL60. Von den neun KRAS-Mutationen traten immerhin sechs in Zelllinien von kolorektalen Karzinomen auf. Insgesamt hatten daher sechs von zehn Kolonkarzinomzelllinien KRAS-Mutationen.

Tatsächlich sind KRAS-Mutationen von hoher klinischer Relevanz beim Kolonkarzinom. Seit Ende 2007 ist mit Cetuximab, einem monoklonalen Antikörper, der gegen den EGFR-Rezeptor gerichtet ist, ein Medikament zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms zugelassen. Allerdings wirkt das Medikament nur dann, wenn keine KRAS-Mutationen vorliegen. Der Grund dafür ist, dass KRAS unterhalb des EGFR-Rezeptors in dessen Signalweg liegt. Eine durch die Mutation bedingte permanente Aktivierung des KRAS führt zu einer ständigen Aktivierung des Signalwegs, unabhängig vom EGFR. Aus diesem Grund bleibt eine Blockade des EGFR's durch Cetuximab wirkungslos. Ein KRAS-Mutationstest ist daher vor der Verschreibung von Cetuximab beim Kolonkarzinom verpflichtend. Eine ähnliche Situation besteht beim Lungenkarzinom. Auch hier sind mit Iressa und Tarceva zwei

Medikamente vorhanden, die spezifisch den EGFR-Rezeptor inhibieren. Im Gegensatz zum Kolonkarzinom ist die Anti-EGFR-Therapie beim Lungenkarzinom jedoch nur dann erfolgversprechend, wenn bestimmte Mutationen im EGFR-Rezeptor-Gen vorliegen. Tumoren mit Wildtyp-EGFR sprechen in der Regel auf die Therapie nicht an. Aber auch hier gilt, dass selbst wenn die EGFR-Mutation vorliegt, eine zusätzliche KRAS-Mutation zu einer Resistenz gegen das Medikament führt (77) (78) (79) (80). In den in dieser Studie eingeschlossenen vier Lungenkarzinomzelllinien wurden keine KRAS-Mutationen festgestellt.

Das Genprodukt des HRAS-Gens ist hochgradig homolog zu dem des KRAS-Gens. Beide Proteine erfüllen dieselbe Funktion, werden jedoch gewebsspezifisch exprimiert. Über HRAS-Mutationen ist in der Literatur vergleichsweise wenig bekannt. Auch in den von mir untersuchten 56 Zelllinien wurden nur zwei Zelllinien mit einer HRAS-Mutation identifiziert, nämlich die Mammakarzinomzelllinie HS578T und das Harnblasenkarzinom ECV 304 (siehe Tabelle 15).

Tumortyp	Zelllinie	HRAS-Mutation	Autor	Quelle
Brustdrüsenkarzinom	HS-578T	G 12 D	O. Ikediobi et al.	(61)
Harnblasenkarzinom	ECV-304	G 12 V	eigene Studie	

**Tab. 15:** Zelllinien mit HRAS-Mutation

Während die HRAS-Mutation in der Mammakarzinomzelllinie bereits bekannt war, ist mit der Harnblasenkarzinomzelllinie ECV 304 eine bisher nicht als mutiert bekannte Zelllinie gefunden worden. Für alle in dieser Studie gefundenen Mutationen gilt, dass sie in der Regel heterozygot waren, d.h. ein Allel als mutiert und das andere Allel als Wildtyp vorliegt. Eine homozygote Mutation wurde nur in sehr seltenen Fällen beobachtet. Homozygot heißt dabei aber vermutlich eher nicht, dass hier beide Allele dieselbe Mutation aufweisen. In Anbetracht der ohnehin geringen Wahrscheinlichkeit für eine einzelne Mutation erscheint es extrem unwahrscheinlich, dass zweimal dieselbe Mutation auftritt. Vielmehr dürfte es sich hierbei um Tumore handeln, bei denen das Chromosom mit dem Wildtyp-Allel ganz oder teilweise deletiert worden ist, so dass nur noch das verbleibende mutierte Allel für die Sequenzierung zugänglich war.

Die 56 in dieser Studie untersuchten Zelllinien sind Teil eines Zelllinienkollektivs von mehr als 140 Zelllinien, die in einem Gewebe-Microarray im Rahmen einer vorhergehenden Doktorarbeit eingebracht worden sind. Mit in-situ-Methoden wurden auf diesem Zelllinien-Array bereits wichtige molekulare Marker für die Entstehung und Fokussion von Tumoren analysiert. Darunter z.B. die Amplifikationen des HER2-Gens und des EGFR-Gens sowie die Proteinexpression des EGFR-Gens oder des p53-Gens. An diesen vorhandenen Daten lässt sich gut die Hypothese testen, dass p53-Mutationen oft zu einer Akkumulation des p53-Proteins im Zellkern führen, die immunhistochemisch detektierbar ist. Von den drei Zelllinien mit neu entdeckter p53-Mutation zeigte allerdings nur eine ein positives Ergebnis in der p53-Immunhistochemie (siehe Abschnitt 3.1.5), nämlich die Zelllinie T98G, die eine Missense-Mutation R273H aufweist, welche zu einer verlängerten Halbwertszeit des p53-Moleküls oder zu einer Proteinstabilisierung durch Komplexbindung zu führen scheint (81). Das negative Immunhistochemie-Resultat der Harnblasenkarzinomzelllinie ECV 304 lässt sich leicht durch die Mutation Y126stop erklären. Dies führt zu einem Kettenabbruch des Proteins, so dass offensichtlich kein Antikörper mehr gebunden werden kann und diese Zelllinie in der Immunhistochemie generell p53-negativ erscheint. Die Mutation M246I, die in der Zelllinie SAOS 2 gefunden wurde, führt möglicherweise zu einer Veränderung der Aminosäurekette innerhalb der Antigenbindungsdomäne des Antikörpers, der zum Nachweis des p53-Proteins verwendet worden ist, so dass auch hier ein negatives Immunhistochemie-Resultat vorlag.

Tierexperimentelle Daten und tumorbiologische Experimente sowie Studien von Tumorpatienten zeigen, dass die Inaktivierung des p53-Signalwegs und der vor und nachgeschalteten Regulatoren, v.a. von DNA-Reparatur, Regulation der Zellzyklus-Kontrolle und der nachgeschalteten Apoptosesignalkaskaden von besonderem Interesse für die Entstehung von Therapieresistenzen sind (82). Die Frage nach sinnvollen und gezielten Therapien zur Überwindung solcher Signalwegsdefekte ist daher der Hintergrund vieler Studien.

Wie bereits dargestellt, sind p53 mutierte Zellen oft resistenter gegenüber chemisch induziertem Zelltod, da die Wirkung zytotoxischer Wirkstoffe und der Bestrahlung nur über funktionelles d.h. Wildtyp-p53 vermittelt werden kann.

Ein weiterer Grund für die unzureichende prognostische Relevanz von einzig auf p53 beschränkten Analysen für Therapieansprechen auf zytotoxische Tumorthérapien dürfte zudem in der Tatsache begründet sein, dass nicht alle Tumorthérapeutika über p53-abhängige Signalwege wirken, sondern die Tumoraktivität auch über andere Signalwege wie z.B. den RAS-Signalweg ablaufen kann. Deshalb ist es von besonderer Bedeutung, dass diese Problematik der unterschiedlichen Signalwege mit ihren jeweiligen Mutationen anhand von Zelllinien als Modellsystem untersucht werden kann.

Aber auch die Therapie bei RAS-Mutationen gestaltet sich schwierig, da, wie bereits erwähnt, Resistenzen gegenüber verschiedenen Medikamenten auftreten können. Dazu zählt z.B. Cetuximab, welches bei Kolorektalkarzinomen zur Anwendung kommt (76) oder auch Iressa, welches primär als Anti-EGFR-Therapie bei NSCLC-Patienten eingesetzt wird (83). Eine Resistenz erklärt sich durch das Vorkommen anderer Mutationen, wie z.B. einer RAS-Mutation, die weiter unten im Pathway ihre Auswirkung zeigt. Somit wäre es möglich anhand von Zelllinien, die gleichzeitig eine EGFR-Mutation und eine RAS-Mutation aufweisen, verschiedene Resistenzmechanismen zu untersuchen, sowie zu erklären, dass manche Tumortypen nicht auf eine Anti-EGFR-Therapie ansprechen. Somit sollte stets vor Beginn einer Anti-EGFR-Therapie eine Analyse auf RAS-Mutationen durchgeführt werden.

So zielt die Therapie für Patienten mit RAS-Mutation, die auf die herkömmlichen Medikamente wie Cetuximab und Iressa nicht ansprechen, auf den RAS-Pathway ab. Es erfolgt alternativ die Therapie mit Farnesyltransferaseinhibitoren, denn RAS-Proteine werden als biologisch inerte Proteine synthetisiert, welche, um volle biologische Aktivität zu erlangen, eine Reihe posttranslationaler Modifikationen durchmachen. Von diesen Modifikationen ist unter anderem die Farnesylierung und Prenylierung für die biologische Funktion wichtig. Inhibitoren, die auf das

katalysierende Enzym, die Farnesyltransferase wirken, hemmen die Maturation vom zellulären RAS-Protein und inhibieren somit das Wachstum RAS-transformierter Tumorzellen (84). Zelllinien, die nach dieser Statusaufnahme keine EGFR-Mutation besitzen, aber eine RAS-Mutation aufweisen, können somit speziell zur Entwicklung einer Anti-RAS-Therapie genutzt werden.

Die systematische Mutationsanalyse von p53, KRAS und HRAS sowie eine Statusaufnahme über EGFR in einer verwandten Dissertation von C. Dammenhayn (85) bilden somit die Grundlage für weiterführende Untersuchungen.

## 5. Resümee

Zusammenfassend leistet die vorliegende Studie einen wertvollen Beitrag zur molekularen Charakterisierung der Zelllinien auf dem Zelllinienarray. Je mehr molekulare Parameter einer Zelllinie bekannt sind, um so optimaler können Zelllinien für funktionelle Studien ausgewählt werden. Tierexperimentelle Daten und tumorbiologische Experimente zeigen, dass die Inaktivierung des p53-Signalwegs und der vor- und nachgeschalteten Regulatoren vor allem von DNA-Reparatur-Regulationen der Zellzykluskontrolle und der nachgeschalteten Apoptosesignalkaskaden von besonderem Interesse für die Entstehung von Therapieresistenzen sind.

Die Frage nach sinnvollen und gezielten Therapien zur Überwindung solcher Signalwegsdefekte ist daher der Hintergrund vieler funktioneller Studien. P53-mutierte Zellen sind oft resistent gegenüber Chemotherapeutika oder Bestrahlung. Diese Therapien wirken über eine Schädigung der DNA und der nachfolgenden Aktivierung von p53, welches dann die Apoptose einleitet. Vor dem Testen von neuen Therapeutika an Zelllinien wäre es also wichtig zu wissen, ob mutiertes oder Wildtyp-p53 vorliegt. Die in dieser Studie identifizierten Zelllinien mit KRAS oder HRAS-Mutationen könnten verwendet werden, um neue Medikamente zu entwickeln, die z.B. eine Resistenz von Anti-EGFR-Therapien umgehen könnten.

Somit bildet die vorliegende Arbeit durch die Mutationsanalyse der tumorrelevanten Gene (p53, HRAS und KRAS) in humanen Zelllinien den Grundstock für weiterführende Forschungsprojekte und in der Entwicklung neuer Tumorthapeutika.

## II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	American Tissue Culture Collection
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GEF	Guan(os)innukleotid-Austauschfaktoren
h	hora, Stunde
het	heterozygot
HER	human epidermal growth factor receptor
hom	homozygot
HWZ	Halbwertszeit
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
M	Molar
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNA	essenger ribonucleic acid, messenger-Ribonukleinsäure

MSI	Mikro Sateliten Instabilität
mTor	mammalian target of rapamycin
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
ng	Nanogramm
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-Kinase
pmol	picomol
PKC	ProteinkinaseC
s.	siehe
sec.	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
TGF	transforming growth factor
T <sub>m</sub>	melting temperature
TMA	Tissue microarray
TNM-Klassifikation	von der International Union Against Cancer (UICC) festgelegte Tumorstadieneinteilung nach der klinisch und histopathologisch bestimmten anatomischen Ausdehnung eines Tumors aufgrund folgender Kriterien: Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T), Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen (N) und Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen (M)
TSG	Tumorsuppressorgen
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett

### III. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Exogene oder endogene Faktoren können zelluläre Protoonkogene aktivieren, so dass die auf zellulärer Ebene dominant wirkenden Onkogene zu einer unkontrollierten Proliferation der Zelle und in der Folge zur Tumorentstehung führen können. Im Gegensatz dazu können wiederum exo- oder endogene Faktoren zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen.** Diese auf zellulärer Ebene rezessiv wirkenden Gene sind dann nicht mehr in der Lage die Zellproliferation zu kontrollieren..... 2
- Abb. 2: Funktionsverlust beider Allele eines Tumorsuppressorgens..... 4**
- Abb. 3: Das p53-Protein kann in drei funktionelle Untereinheiten unterteilt werden.** Das Aminoende (rot) ist entscheidend für die Funktion des Proteins als Transkriptionsfaktor. Grün dargestellt ist die DNA-bindende-Domäne. Das Carboxylende sorgt für die Oligomerisation des Proteins. Zusätzlich sind die für die Lokalisation des Proteins in den Zellkern maßgeblichen Sequenzen dargestellt (gelb)..... 6
- Abb. 4: Innerhalb der DNA-bindenden-Domäne finden sich nahezu alle bekannten Mutationsstellen im p53-Gen.** Dargestellt ist die Frequenz der Mutationen für einzelne Codons. Mit römischen Ziffern markiert sind die hochkonservierten Anteile des Proteins.... 7
- Abb. 5: Modell für Regulation der subzellulären Lokalisation von p53.** Assoziation an Mikrotubuli dirigiert p53 in Richtung Zellkern mittels elektrostatischer Wechselwirkungen mit Dynein. Für den Import in den Zellkern sorgt die Bindung des Carboxylendes an Rezeptoren des Zellkerns. Der Export von p53 und MDM2 aus dem Zellkern wird vermutlich durch Ubiquitinierung vermittelt. .... 8
- Abb. 6: Die für die Regulation der p53-Aktivität durch posttranslatorische Modifikation durch Acetylierung (Ac), Phosphorylierung (P), Sumoylierung (S) und Ubiquitinierung (Ub) maßgeblichen Bindungsstellen sind hier wiedergegeben. .... 8**

**Abb. 7: p53 gebunden an DNA. In vivo existiert p53 als Tetramer.** In vitro ist eine DNA-Bindung auch ohne eine Oligomerisation beschrieben und einzelne Anteile der zentralen Region können mit etwa einem Fünftel der Affinität des intakten Proteins an DNA binden. In der Zelle ist die Tetramerisation jedoch unabdingbar für die adäquate Funktion von p53. .... 9

**Abb. 8: Sequenzvergleichen der RAS-Proteine** (identische Sequenz im Bereich der rot dargestellten Switch-I-Region und der orange dargestellten Switch-II-Region. Sie variieren jedoch in der gelb dargestellten hypervariablen Region) (40). .... 11

**Abb. 9: RAS und Effektorinteraktion: Nach Aktivierung von RAS-Proteinen können eine Vielzahl von Effektoren aktiviert werden, die unterschiedliche Signalwege einleiten.** .... 13

**Abb. 10: Schalterfunktion von RAS-Proteinen** ..... 14

**Abb. 11: 3 Beispiele für PCR-Produkt Analyse mit einem Elektrophorese-Gel für p53, HRAS und KRAS** ..... 26

**Abb. 12: IHC von p53 an den Zelllinien T98G und SAOS2** ..... 41

**Abb. 13: IHC von p53 und RAS an der Zelllinie ECV-304** ..... 41

## **IV. Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1:</b> Inzidenz mutierter RAS-Isoformen in menschlichen Tumoren.....	12
<b>Tab. 2:</b> Verwendete Zelllinien.....	19
<b>Tab. 3:</b> Ansatzreihe für verwendete PCR-Ansätze .....	23
<b>Tab. 4:</b> PCR-Programme.....	24
<b>Tab. 5:</b> Verwendete PCR-Primer.....	25
<b>Tab. 6:</b> Referenzsequenz-Identifikationsnummern.....	30
<b>Tab. 7:</b> Codontabelle zur Darstellung der zugehörigen Aminosäuren.....	32
<b>Tab. 8:</b> DNA Konzentrationen der Zelllinien-Extrakte .....	35
<b>Tab. 9:</b> Übersicht der gesamten Zelllinien für die p53-Untersuchung .....	37
<b>Tab. 10:</b> Übersicht der gesamten Zelllinie für KRAS- und HRAS-Untersuchung .....	39
<b>Tab. 11:</b> Zusammenstellung der Zelllinien mit p53-, KRAS- und HRAS-Mutationen .....	40
<b>Tab. 12:</b> Immunhistochemie und Auswirkung .....	41
<b>Tab. 13:</b> Zelllinien mit bekannten KRAS-, HRAS- und p53-Mutation.....	45
<b>Tab. 14:</b> Zelllinien mit neuen p53-Mutationen.....	46
<b>Tab. 15:</b> Zelllinien mit HRAS-Mutation .....	47

## V. Literaturverzeichnis

1. Boveri, T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, p. 22. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1914.
2. Knudson, A. G. Cancer genetics. *Am J Med Genet*, 111: 96-102, 2002.
3. Löffler, G. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 4th edition, p. 683 + p. 362. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hongkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio: Springer Verlag, 2001.
4. Horn, F., Lindenmeier, G., Moc, I., Grillhösl, C., Berghold, S., Schneider, N., and Münster, B. Biochemie des Menschen, 1st edition, p. 265-267 + p. 306-312. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag, 2002.
5. Sager, R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*, 246: 1406-1412, 1989.
6. Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Jr., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A., and et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250: 1233-1238, 1990.
7. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265: 346-355, 1994.
8. Loeb, L. A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res*, 51: 3075-3079, 1991.
9. Hartwell, L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, 71: 543-546, 1992.
10. Orr-Weaver, T. L. and Weinberg, R. A. A checkpoint on the road to cancer. *Nature*, 392: 223-224, 1998.
11. Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., and Hartwell, L. H. When checkpoints fail. *Cell*, 88: 315-321, 1997.

12. Tomlinson, I. P., Novelli, M. R., and Bodmer, W. F. The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 14800-14803, 1996.
13. Hamelin, R., Chalastanis, A., Colas, C., El Bchiri, J., Mercier, D., Schreurs, A. S., Simon, V., Svrcek, M., Zaanani, A., Borie, C., Buhard, O., Capel, E., Zouali, H., Praz, F., Muleris, M., Flejou, J. F., and Duval, A. [Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers]. *Bull Cancer*, 95: 121-132, 2008.
14. Paulson, T. G., Wright, F. A., Parker, B. A., Russack, V., and Wahl, G. M. Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res*, 56: 4021-4026, 1996.
15. Ryan, K. M., Phillips, A. C., and Vousden, K. H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*, 13: 332-337, 2001.
16. Bates, S. and Vousden, K. H. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 55: 28-37, 1999.
17. Vousden, K. H. p53: death star. *Cell*, 103: 691-694, 2000.
18. Miyashita, T. and Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80: 293-299, 1995.
19. Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., and Taya, Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 102: 849-862, 2000.
20. Nakano, K. and Vousden, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7: 683-694, 2001.
21. Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*, 7: 673-682, 2001.
22. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288: 1053-1058, 2000.

23. Lin, Y., Ma, W., and Benchimol, S. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet*, 26: 122-127, 2000.
24. Woods, D. B. and Vousden, K. H. Regulation of p53 function. *Exp Cell Res*, 264: 56-66, 2001.
25. Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T. D. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*, 14: 278-288, 2000.
26. Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, 14: 289-300, 2000.
27. Vousden, K. H. and Woude, G. F. The ins and outs of p53. *Nat Cell Biol*, 2: E178-180, 2000.
28. Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., and Del Sal, G. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J*, 18: 6462-6471, 1999.
29. Gu, W. and Roeder, R. G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 90: 595-606, 1997.
30. Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., and Hay, R. T. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J*, 18: 6455-6461, 1999.
31. de Vries, J. E., ten Kate, J., and Bosman, F. T. p21ras in carcinogenesis. *Pathol Res Pract*, 192: 658-668, 1996.
32. Bos, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49: 4682-4689, 1989.
33. Harvey, J. J. An Unidentified Virus Which Causes The Rapid Production Of Tumours In Mice. *Nature*, 204: 1104-1105, 1964.
34. Kirsten, W. H. and Mayer, L. A. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst*, 39: 311-335, 1967.

35. Shimizu, K., Goldfarb, M., Suard, Y., Perucho, M., Li, Y., Kamata, T., Feramisco, J., Stavnezer, E., Fogh, J., and Wigler, M. H. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80: 2112-2116, 1983.
36. Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A., and Katsuki, M. K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene*, 15: 1151-1159, 1997.
37. Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., and Marshall, C. J. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, 57: 1167-1177, 1989.
38. Furth, M. E., Aldrich, T. H., and Cordon-Cardo, C. Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene*, 1: 47-58, 1987.
39. Leon, J., Guerrero, I., and Pellicer, A. Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol*, 7: 1535-1540, 1987.
40. Bar-Sagi, D. A Ras by any other name. *Mol Cell Biol*, 21: 1441-1443, 2001.
41. Demunter, A., Stas, M., Degreef, H., De Wolf-Peeters, C., and van den Oord, J. J. Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Invest Dermatol*, 117: 1483-1489, 2001.
42. Fiorucci, G. and Hall, A. All three human ras genes are expressed in a wide range of tissues. *Biochim Biophys Acta*, 950: 81-83, 1988.
43. Rodenhuis, S. ras and human tumors. *Semin Cancer Biol*, 3: 241-247, 1992.
44. Kim, K., Lindstrom, M. J., and Gould, M. N. Regions of H- and K-ras that provide organ specificity/potency in mammary cancer induction. *Cancer Res*, 62: 1241-1245, 2002.
45. Edkins, S., O'Meara, S., Parker, A., Stevens, C., Reis, M., Jones, S., Greenman, C., Davies, H., Dalgliesh, G., Forbes, S., Hunter, C., Smith, R., Stephens, P., Goldstraw, P., Nicholson, A., Chan, T. L., Velculescu, V. E., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Stratton, M. R., and Futreal, P. A. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*, 5: 928-932, 2006.

46. Grand, R. J. and Owen, D. The biochemistry of ras p21. *Biochem J*, 279 (Pt 3): 609-631, 1991.
47. Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349: 117-127, 1991.
48. de Vos, A. M., Tong, L., Milburn, M. V., Matias, P. M., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E., and Kim, S. H. Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science*, 239: 888-893, 1988.
49. Pai, E. F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K. C., John, J., and Wittinghofer, A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature*, 341: 209-214, 1989.
50. Kahn, S. M., Jiang, W., Culbertson, T. A., Weinstein, I. B., Williams, G. M., Tomita, N., and Ronai, Z. Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene*, 6: 1079-1083, 1991.
51. Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, M., Santini, D., and Tonini, G. The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol*, 68: 93-106, 2008.
52. Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur*, 1st edition.: Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
53. Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, 5th edition, p. 122-137. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
54. Lottspeich, F. and Engels, J. W. H. *Bioanalytik*, 2nd edition, p. 638; p.787. Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
55. Mülhardt, C. *Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 3rd edition, p. 72. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.

56. Schrimpf, G. H. *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 3rd edition, p. 72-73; p. 148-151. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
57. Lorenzi, P. L., Reinhold, W. C., Varma, S., Hutchinson, A. A., Pommier, Y., Chanock, S. J., and Weinstein, J. N. DNA fingerprinting of the NCI-60 cell line panel. *Mol Cancer Ther*, 8: 713-724, 2009.
58. Scherf, U., Ross, D. T., Waltham, M., Smith, L. H., Lee, J. K., Tanabe, L., Kohn, K. W., Reinhold, W. C., Myers, T. G., Andrews, D. T., Scudiero, D. A., Eisen, M. B., Sausville, E. A., Pommier, Y., Botstein, D., Brown, P. O., and Weinstein, J. N. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet*, 24: 236-244, 2000.
59. Ross, D. T., Weinstein, J. N., Botstein, D., and Brown, P. O. NCI 60 Microarray Cancer Project / The web supplement to D.T. Ross et al.(2000). <http://genome-www.stanford.edu/nci60/index.shtml>, 2000.
60. Shahrzad, S., Quayle, L., Stone, C., Plumb, C., Shirasawa, S., Rak, J. W., and Coomber, B. L. Ischemia-induced K-ras mutations in human colorectal cancer cells: role of microenvironmental regulation of MSH2 expression. *Cancer Res*, 65: 8134-8141, 2005.
61. Ikediobi, O. N., Davies, H., Bignell, G., Edkins, S., Stevens, C., O'Meara, S., Santarius, T., Avis, T., Barthorpe, S., Brackenbury, L., Buck, G., Butler, A., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Hunter, C., Jenkinson, A., Jones, D., Kosmidou, V., Lugg, R., Menzies, A., Mironenko, T., Parker, A., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Smith, R., Solomon, H., Stephens, P., Teague, J., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Reinhold, W., Weinstein, J. N., Stratton, M. R., Futreal, P. A., and Wooster, R. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol Cancer Ther*, 5: 2606-2612, 2006.
62. Leboeuf, R., Baumgartner, J. E., Benezra, M., Malaguarnera, R., Solit, D., Pratilas, C. A., Rosen, N., Knauf, J. A., and Fagin, J. A. BRAFV600E mutation is associated with

- preferential sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibition in thyroid cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 2194-2201, 2008.
63. Minamoto, T., Buschmann, T., Habelhah, H., Matusevich, E., Tahara, H., Boerresen-Dale, A. L., Harris, C., Sidransky, D., and Ronai, Z. Distinct pattern of p53 phosphorylation in human tumors. *Oncogene*, 20: 3341-3347, 2001.
64. Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajerova, A., Dehner, A., Klein, C., Pan, H., Kessler, H., Pancoska, P., and Moll, U. M. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem*, 281: 8600-8606, 2006.
65. sangerintitute Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA, UK: 909704, 2006.
66. Mizuarai, S., Yamanaka, K., and Kotani, H. Mutant p53 induces the GEF-H1 oncogene, a guanine nucleotide exchange factor-H1 for RhoA, resulting in accelerated cell proliferation in tumor cells. *Cancer Res*, 66: 6319-6326, 2006.
67. Lopez-Knowles, E., Hernandez, S., Kogevinas, M., Lloreta, J., Amoros, A., Tardon, A., Carrato, A., Kishore, S., Serra, C., Malats, N., and Real, F. X. The p53 pathway and outcome among patients with T1G3 bladder tumors. *Clin Cancer Res*, 12: 6029-6036, 2006.
68. sangerintitute Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA, UK: 906828, 2006.
69. Malaguarnera, R., Mandarino, A., Mazzon, E., Vella, V., Gangemi, P., Vancheri, C., Vigneri, P., Aloisi, A., Vigneri, R., and Frasca, F. The p53-homologue p63 may promote thyroid cancer progression. *Endocr Relat Cancer*, 12: 953-971, 2005.
70. Alonso, M., Tamasdan, C., Miller, D. C., and Newcomb, E. W. Flavopiridol induces apoptosis in glioma cell lines independent of retinoblastoma and p53 tumor suppressor pathway alterations by a caspase-independent pathway. *Mol Cancer Ther*, 2: 139-150, 2003.

71. sangerintitute Catalogue of Somatic Mutaions in Cancer. Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA, UK: 906868, 2006.
72. Jia, L. Q., Osada, M., Ishioka, C., Gamo, M., Ikawa, S., Suzuki, T., Shimodaira, H., Niitani, T., Kudo, T., Akiyama, M., Kimura, N., Matsuo, M., Mizusawa, H., Tanaka, N., Koyama, H., Namba, M., Kanamaru, R., and Kuroki, T. Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay. *Mol Carcinog*, 19: 243-253, 1997.
73. Wong, R. P., Tsang, W. P., Chau, P. Y., Co, N. N., Tsang, T. Y., and Kwok, T. T. p53-R273H gains new function in induction of drug resistance through down-regulation of procaspase-3. *Mol Cancer Ther*, 6: 1054-1061, 2007.
74. Balin-Gauthier, D., Delord, J. P., Rochaix, P., Mallard, V., Thomas, F., Hennebelle, I., Bugat, R., Canal, P., and Allal, C. In vivo and in vitro antitumor activity of oxaliplatin in combination with cetuximab in human colorectal tumor cell lines expressing different level of EGFR. *Cancer Chemother Pharmacol*, 57: 709-718, 2006.
75. Benvenuti, S., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Zanon, C., Moroni, M., Veronese, S., Siena, S., and Bardelli, A. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res*, 67: 2643-2648, 2007.
76. Lievre, A., Bachet, J. B., Boige, V., Cayre, A., Le Corre, D., Buc, E., Ychou, M., Bouche, O., Landi, B., Louvet, C., Andre, T., Bibeau, F., Diebold, M. D., Rougier, P., Ducreux, M., Tomasic, G., Emile, J. F., Penault-Llorca, F., and Laurent-Puig, P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*, 26: 374-379, 2008.
77. Vatan, O., Bilaloglu, R., Tunca, B., Cecener, G., Gebitekin, C., Egeli, U., Yakut, T., and Urer, N. Low frequency of p53 and k-ras codon 12 mutations in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) tumors and surgical margins. *Tumori*, 93: 473-477, 2007.
78. Casson, A. G., Wilson, S. M., McCart, J. A., O'Malley, F. P., Ozcelik, H., Tsao, M. S., and Chambers, A. F. ras mutation and expression of the ras-regulated genes

- osteopontin and cathepsin L in human esophageal cancer. *Int J Cancer*, 72: 739-745, 1997.
79. Sasaki, H., Okuda, K., Kawano, O., Endo, K., Yukiue, H., Yokoyama, T., Yano, M., and Fujii, Y. Nras and Kras mutation in Japanese lung cancer patients: Genotyping analysis using LightCycler. *Oncol Rep*, 18: 623-628, 2007.
80. Marks, J. L., Broderick, S., Zhou, Q., Chitale, D., Li, A. R., Zakowski, M. F., Kris, M. G., Rusch, V. W., Azzoli, C. G., Seshan, V. E., Ladanyi, M., and Pao, W. Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 3: 111-116, 2008.
81. Kandioler-Eckersberger, D., Kappel, S., Ludwig, C., Janschek, E., Mannhalter, C., and Eckersberger, F. Prognostic and predictive implications of p53. *European Surgery, Volume 32, Number 2*: 68-72, 2000.
82. Daniel, P. Zellzyklus und Apoptose: Molekulare Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2003.
83. Lind, J. S., Herder, G. J., and Smit, E. F. [New therapies for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: inhibitors of the epidermal growth factor receptor and angiogenesis]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 152: 928-932, 2008.
84. Beaupre, D. M. and Kurzrock, R. RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. *J Clin Oncol*, 17: 1071-1079, 1999.
85. Dammenhayn, C. Mutationen von Zielgenen für genspezifische Therapien (EGFR, KIT, PDGFR) in humanen Zelllinien. 2009.

## **VI. Danksagung**

Beginnen möchte ich mit den Personen, denen meine Dissertation gewidmet ist, mit meiner Familie. Ohne die uneingeschränkte Unterstützung meiner Eltern, meiner Großeltern, sowie meines Bruders wäre mein Studium, sowie diese Dissertation nicht möglich gewesen. Sie waren immer für mich da und haben mich in allen Situationen unterstützt.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Guido Sauter, sowie PD Dr. Ronald Simon, die mich sowohl im praktischen Teil, als auch beim Erarbeiten der Dissertation im theoretischen Teil sehr gut unterstützt haben. Sowie dem gesamten Laborteam besonders Gaby und Agatha, die beide nie abgeneigt waren, einem zum teil verzweifelten Doktoranden zu helfen.

Nicht unerwähnt dürfen auch Andreas Dammenhayn, Jennifer Sternberg und Alexander Kirsch, sowie alle weiteren Freunde bleiben, die mich in der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt jedoch, meiner Freundin Claudia. Sie ist zu jeder Zeit für mich da, sei es im Rahmen meiner Dissertation oder der Examensvorbereitungen sowie während des Studiums hat sie mich begleitet und mich jederzeit mit voller Kraft unterstützt. Ich möchte mich hiermit für ihre aufgebrauchte Kraft, ihre Unterstützung, ihre Geduld und ihr Verständnis in diesem Rahmen ganz herzlich bei ihr bedanken. Denn ohne Sie hätte ich vieles im Leben nicht erreicht.

Vielen Dank für Alles.

## **VII. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: \_\_\_\_\_

( Sascha Baumann )