

**Institut für Ernährungswissenschaft**

**Ernährungstoxikologie**

---

**LNA-clamp-PCR**  
**zum sensitiven Nachweis von Punktmutationen**  
**im Rahmen der Entwicklung eines**  
**Darmkrebsfrüherkennungstests**

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades**  
**„doctor rerum naturalium“**  
**(Dr. rer. nat)**  
**in der Wissenschaftsdisziplin „Ernährungswissenschaft / Toxikologie“**

**eingereicht an der**  
**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**  
**der Universität Potsdam**

**von**  
**Daniela Schatz**

**Potsdam, Mai 2010**

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2011/5230/>  
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-52308>  
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-52308>



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abbildungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung und Aufgabenstellung.....	1
1.1 Darmkrebs.....	1
1.1.1 Klassifikation der Tumorstadien.....	2
1.2 Darmkrebsdiagnostik.....	2
1.3 Molekulare Grundlagen.....	3
1.3.1 Molekulare Stuhl-Marker in der Darmkrebsdiagnostik.....	3
1.3.2 DNA-basierte Marker.....	4
1.3.3 Tumor-DNA in Stuhl.....	5
1.4 Die Begriffe Sensitivität und Spezifität.....	5
1.5 Methoden zur Detektion von Punktmutationen.....	6
1.5.1 Markerfindung (unbekannte Mutationen).....	7
1.5.2 Detektion von bekannten Punktmutation.....	7
1.5.3 Verfahren mit hohem Detektionslimit.....	13
1.6 Aufgabenstellung.....	15
2 Rahmenprojekt .....	16
2.1 Biologische Grundlagen zur Erstellung eines Markersets.....	16
2.1.1 Der Wnt-Signalweg.....	17
2.1.2 Der Ras-Raf-MEK-MAPK-Signalweg.....	18
2.2 Mutationscreening zur Erstellung des Markersets.....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 „Realtime“-PCR.....	20
3.1.1 Verwendete Detektionsverfahren in der „realtime“-PCR.....	20
3.1.2 Schmelzkurvenanalyse.....	21
3.1.3 Detektion und Auswertung der „realtime“-PCR Experimente.....	21
3.1.4 Entwurf von Oligonukleotiden.....	21
3.2 Erstellen der Plasmidmodellsysteme.....	22
3.2.1 Primer.....	22
3.2.2 Verwendete Genfragmente.....	23
3.2.3 DNA-Extraktion und Aufreinigung.....	24
3.2.4 Amplifikate für die Plasmidherstellung.....	24
3.2.5 PCR-Mutagenese.....	24
3.2.6 Gelelektrophorese.....	25
3.2.7 Gelextraktion von PCR-Produkten und Plasmiden.....	25

3.2.8	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	25
3.2.9	Klonierung.....	26
3.2.10	Plasmidpräparation.....	26
3.2.11	Überprüfung der Klonierung.....	26
3.2.12	Linearisierung.....	26
3.2.13	Sequenzierung.....	26
3.2.14	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	27
3.2.15	Berechnung der Kopienzahl.....	27
3.2.16	Verdünnungen und Mischungen.....	27
3.2.17	Überprüfung der Verdünnungen mittels CT-Wert.....	28
3.3	Evaluierung verschiedener Methoden zum Nachweis von Punktmutationen.....	28
3.3.1	Oligonukleotidligation.....	28
3.3.2	Allelspezifische PCR.....	30
3.4	Etablierung des Nachweissystems zur Punktmutationsdetektion: Schmelzkurvenanalyse.....	31
3.4.1	Relatives Detektionslimit der Schmelzkurvenanalyse.....	31
3.4.2	Protokolle und Oligonukleotidsequenzen zur Schmelzkurvenanalyse.....	31
3.4.3	Sequenzierung.....	33
3.5	Etablierung der Methode zur Anreicherung von Punktmutationen: LNA-clamp-PCR.....	34
3.5.1	LNA.....	34
3.5.2	Prinzip der LNA-clamp-PCR.....	34
3.5.3	LNA-Blocker-Entwurf.....	35
3.5.4	Berechnung der Schmelztemperatur von LNA-Oligonukleotiden.....	35
3.5.5	Protokolle der LNA-clamp-PCRs.....	36
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Erstellen der Plasmidmodellsysteme.....	40
4.2	Evaluierung verschiedener Methoden zum Nachweis von Punktmutationen.....	41
4.2.1	Oligonukleotidligation.....	41
4.2.2	Allelspezifische PCR.....	41
4.3	Etablierung des Nachweissystems zur Punktmutationsdetektion: Schmelzkurvenanalyse .....	43
4.3.1	Entwicklung der Nachweisverfahren zur Punktmutationsdetektion.....	43
4.3.2	Punktmutationsdetektion in Sequenzmischungen.....	46
4.3.3	Amplifikations- und Schmelzkurven in Anwesenheit von Blocker.....	48
4.3.4	Unterschiedliche Schmelztemperaturen ohne und mit Blocker.....	48
4.4	Etablierung der Methode zur Anreicherung von Punktmutationen: LNA-clamp-PCR.....	49
4.4.1	LNA als Primerblocker bei BRAF.....	51
4.4.2	LNA als Amplifikationsblocker bei BRAF.....	53
4.4.3	LNA als Amplifikationsblocker bei CTNNB1.....	59

4.4.4	LNA als Amplifikationsblocker und Detektionssonde bei K-ras.....	63
4.4.5	Verwendung von Polymerase ohne Exonukleasefunktion.....	65
5	Diskussion.....	67
5.1	Verwendung der Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung des Detektionslimits .....	67
5.2	Auswahl eines geeigneten Verfahrens zur Anreicherung von Punktmutationen.....	68
5.3	Clamp-PCR.....	68
5.3.1	Verwendung von LNA als Blocker.....	69
5.4	Optimierung der LNA-clamp-PCR.....	70
5.4.1	Der Entwurf des Blockers.....	70
5.4.2	Die Blockereffizienz als Kennzahl für die LNA-clamp-PCR-Optimierung.....	72
5.4.3	Der Einfluss der LNA-DNA-Basenfehlpaarungen auf die Blockierung.....	72
5.4.4	Die Verwendung von LNA als Primerblocker.....	75
5.4.5	Die Verwendung von LNA als Amplifikationsblocker.....	75
5.4.6	Die Verwendung von Polymerase ohne 5'-3'-Exonukleasefunktion.....	77
5.5	Vergleich der etablierten Nachweisverfahren mit der Literatur.....	78
5.6	Erzielte Detektionslimits in Hinblick auf die Analyse von Stuhlproben.....	79
5.6.1	Weitere Verbesserung des Detektionslimits.....	80
5.7	Universelle Einsetzbarkeit der LNA-clamp-PCR.....	81
5.8	Ausblick.....	82
6	Zusammenfassung.....	84
7	Summary.....	86
8	Literaturverzeichnis.....	88
9	Anhang.....	94
9.1	Geräte.....	94
9.2	Chemikalien.....	94
9.3	Puffer und Lösungen.....	94
9.4	Enzyme und Molekularbiologische Reagenzien.....	95
9.5	Abkürzungsverzeichnis.....	96
10	Danksagung.....	97

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Darmkrebsstadien.....	2
Abbildung 1.2: Übergang vom gutartigen Polyp bzw. Adenom zu Darmkrebs.....	2
Abbildung 1.3: Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese .....	4
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer allelspezifischen Hybridisierung .....	9
Abbildung 1.5: Funktionsprinzip FRET-Hybridisierungssonden.....	9
Abbildung 1.6: Funktionsprinzip Taqman-Sonde.....	9
Abbildung 1.7: Funktionsprinzip der dHPLC-Analyse.....	10
Abbildung 1.8: Funktionsprinzip der SSCP-Analyse.....	10
Abbildung 1.9: Funktionsprinzip der Minisequenzierung.....	11
Abbildung 1.10: Funktionsprinzip der Oligonukleotidligation.....	12
Abbildung 1.11: Funktionsprinzip des Invader-Verfahrens.....	12
Abbildung 1.12: Funktionsprinzip der RFLP-Analyse.....	12
Abbildung 1.13: Funktionsprinzips einer allel-spezifischen PCR.....	14
Abbildung 2.1: Der Wnt-Signaltransduktionsweg.....	17
Abbildung 2.2: Der Ras-Raf-MEK-MAPK-Signaltransduktionsweg.....	18
Abbildung 3.1: Prinzipien der verwendeten Detektionssysteme.....	21
Abbildung 3.2: Schema der PCR-Mutagenese.....	24
Abbildung 3.3: Oligonukleotidligation.....	29
Abbildung 3.4: LNA-Monomer.....	34
Abbildung 3.5: C3'-endo-Konformation eines LNA-Monomers .....	34
Abbildung 4.1: Übersichtsgraphik der in dieser Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte zur Entwicklung eines Nachweissystems für im Unterschuss vorliegende mutierte Genfragmente.....	39
Abbildung 4.2: Beispielkurven von BRAF zur Überprüfung der Plasmidverdünnungen.....	40
Abbildung 4.3: Allelspezifische PCR für BRAF.....	42
Abbildung 4.4: CTNNB1: Lage der Primer und Sonden zur Punktmutationsdetektion nach LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker .....	43
Abbildung 4.5: CTNNB1: Schmelzkurven der Hybridisierungssonden zur Punktmutationsdetektion..	44
Abbildung 4.6: BRAF: Lage der Primer und Sonden zur Punktmutationsdetektion nach LNA-clamp-PCR mit Primerblocker .....	45
Abbildung 4.7: BRAF: Lage der Primer und Sonden zur Punktmutationsdetektion nach LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker .....	45
Abbildung 4.8: K-ras: Lage der Primer und Sonden zur Punktmutationsdetektion nach LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker.....	46

Abbildung 4.9: K-ras: Schmelzkurven von Mischungen aus Wildtyp-DNA und mutierter DNA (Codon 12 GGT-->GAT).....	47
Abbildung 4.10: Versuchsprinzipien der LNA-clamp-PCR.....	49
Abbildung 4.11: BRAF: LNA als Primerblocker: Positionen und Sequenzen des Blockers und der Primer.....	51
Abbildung 4.12: BRAF: LNA-clamp-PCR mit Primerblocker: Schmelzkurven zur Bestimmung des Detektionslimits.....	53
Abbildung 4.13: BRAF: LNA als Amplifikationsblocker: Positionen und Sequenzen des Blockers und der Primer.....	53
Abbildung 4.14: BRAF: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Einfluss der Blockerkonzentration auf das Detektionslimit.....	54
Abbildung 4.15: BRAF: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Einfluss des Temperaturprogramms auf das Detektionslimit.....	56
Abbildung 4.16: BRAF: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Das erzielte Detektionslimit beträgt 1:10 000. ....	58
Abbildung 4.17: CTNNB1: LNA als Amplifikationsblocker: Positionen und Sequenzen der Blocker und Primer.....	59
Abbildung 4.18: CTNNB1: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Schmelzkurven zur Bestimmung des Detektionslimits für Codon 41 ACC --> GCC.....	61
Abbildung 4.19: CTNNB1: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Sequenzierkurven Codon 41	62
Abbildung 4.20: CTNNB1: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Schmelzkurven zur Bestimmung des Detektionslimits für Codon 45 TCT --> CCT.....	62
Abbildung 4.21: K-ras:: LNA als Amplifikationsblocker: Positionen und Sequenzen des Blockers und der Primer.....	63
Abbildung 4.22: K-ras: LNA als Amplifikationsblocker: Einfluss der Blockerkonzentration.....	63
Abbildung 4.23: K-ras: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Schmelzkurven zur Bestimmung des Detektionslimits für Codon 12 GGT --> TGT bei verschiedenen Elongationstemperaturen.....	64

# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

## 1.1 Darmkrebs

Als Darmkrebs werden alle malignen Tumore in den Bereichen des Dickdarms (Kolonkarzinom) und des Mastdarms (Rektumkarzinom) bezeichnet.

Das kolorektale Karzinom ist nach Lungenkrebs die zweithäufigste malignombedingte Todesursache in westlichen Industrieländern. Im Jahr 2004 starben in Deutschland 27.782 Menschen an Darmkrebs. Die jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland beliefen sich 2004 nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts bei Männern auf 37.250 und bei Frauen auf 36.000. Somit ist Darmkrebs nach Prostata- bzw. Brustkrebs die jeweils zweithäufigste Krebsneuerkrankung. Weltweit erkranken jährlich 945 000 Menschen an Darmkrebs und 492 000 sterben an den Folgen einer Darmkrebserkrankung (Weitz et al. 2005).

Ursache für die Entstehung von Darmkrebs sind Veränderungen im Erbmateriale, die Zellzyklus, Apoptose, Zelladhäsion oder Angiogenese betreffen. Welche äußeren Einflüsse für diese Genveränderungen verantwortlich sind, ist bisher nicht im Einzelnen geklärt. Allerdings gibt es Faktoren, die das Risiko erhöhen. Dazu gehören fettreiche und ballaststoffarme Ernährung, vermehrter Alkoholgenuß und Rauchen sowie ein hoher Body-Mass-Index (dkfz: Krebsinformationsdienst). Viel Bewegung und gemüsereiche Ernährung senken dagegen das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken (Potter, 1997). Die schädigende Wirkung der krebsauslösenden Faktoren ist auch von der Dauer ihres Einwirkens abhängig. Dazu kommt die Zunahme der Instabilität des Erbmaterials mit den Jahren, weshalb Darmkrebs eine Alterserkrankung ist (dkfz: Krebsinformationsdienst). Bei unter 50jährigen treten Darmtumore vergleichsweise selten auf.

Klassifikation nach Dukes	Dukes A = Stadium I	Dukes B = Stadium II	Dukes C = Stadium III	Dukes D = Stadium IV
Klassifikation nach TNM	T1-2N0M0	T3-4N0M0	T1-4N1-2M0	T1-4N0-2M1
Befall	Nur die oberen Zellschichten des Epithels betroffen, kein Lymphknotenbefall, keine Organmetastasen	Alle Darmwandschichten befallen, Lymphknotenbefall nicht nachweisbar, keine Organmetastasen	Regionale Lymphknoten befallen	Organmetastasen (meist Leber)
5- Jahresüberlebensrate	95%	85%	53%	8%
Häufigkeit bei Erstdiagnose	39%		61%	

Tabelle 1.1: Klassifikation der Dickdarmkrebsstadien, 5-Jahresüberlebensrate ([www.medicoconsult.de](http://www.medicoconsult.de)) und Häufigkeit bei Erstdiagnose (American Cancer Society, 2008)

Trotz des langwierigen Entstehungsprozesses von Darmtumoren wird die Diagnose in der Regel erst bei fortgeschrittenen Tumorstadien gestellt. Die Prognose des kolorektalen Karzinoms ist jedoch stark von dem Stadium der Tumorerkrankung abhängig (Tabelle 1.1).

### 1.1.1 Klassifikation der Tumorstadien

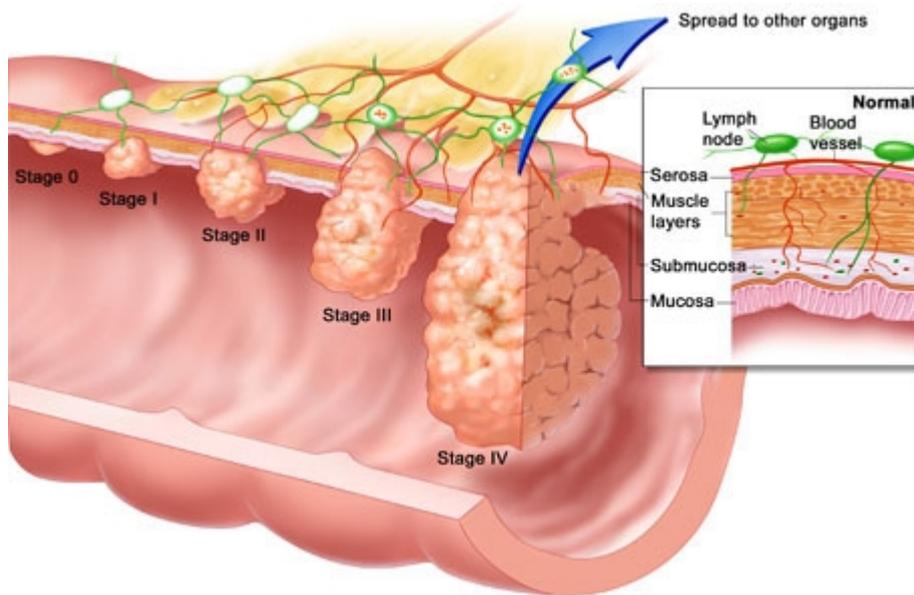


Abbildung 1.1: Darmkrebstadien

Dargestellt sind die Stadien I bis IV nach Dukes und die damit verbundene Ausdehnung der Tumoren.  
[www.gastrocentralva.com](http://www.gastrocentralva.com)

Die Klassifikation von Tumoren in Stadien erfolgt je nach Ausbreitung. Dabei werden die Größe des Tumors (T), die Beteiligung der Lymphknoten (N = Node) und das Vorhandensein von Metastasen (M) mit einbezogen. Um die Ausdehnung genauer einzugrenzen, werden Ziffern verwendet. Die Ausdehnung des Primärtumors wird mit T1 – 4 beschrieben, Zahl und Lage der befallenen Lymphknoten mit N0 – 3 und das Vorhandensein von Metastasen mit M0 – 1. Die alte Klassifikation nach Dukes Stadien A bis D bzw. I bis IV (Abbildung 1.1) wird teilweise ebenfalls noch verwendet.

### 1.2 Darmkrebsdiagnostik

90% aller Darmkrebserkrankungen entstehen aus langsam wachsenden, zunächst gutartigen Polypen oder Adenomen. Die meisten Adenome sind kleiner als 1 cm im Durchmesser und gutartig. Nur wenige werden größer als 1 cm und entarten zu malignen Darmtumoren. Da das ein langwieriger Prozess ist, der schätzungsweise 10 – 15 Jahre dauert, bietet dieser Zeitraum gute Möglichkeiten der Früherkennung und Abtragung während einer Vorsorgeuntersuchung (Abbildung 1.2).

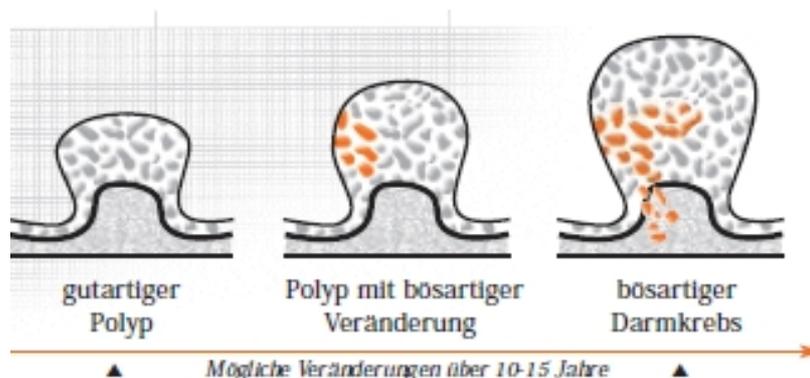


Abbildung 1.2: Übergang vom gutartigen Polyp bzw. Adenom zu Darmkrebs  
 (www.gesundheit.uni-hamburg.de)

Wird Darmkrebs in frühen Stadien erkannt, sind die Heilungsaussichten sehr gut. Im Rahmen des gesetzlichen Krebsfrüherkennungsprogramms haben Personen ab 50 Jahre einen Anspruch auf regelmäßige Untersuchung. Dabei wird ein Test auf verstecktes (okkultes) Blut (Hämokulttest; FOBT, faecal occult blood test) durchgeführt. Dieser Test ist nichtinvasiv und verursacht nur geringe Kosten, weist allerdings für Karzinome nur eine mäßige und für Adenome eine geringe Sensitivität auf. Die Gesamtsensitivität liegt bei nur 43% (Tibble et al., 2001). Zudem ist Blut im Stuhl nicht spezifisch und kann auch andere Ursachen haben. Zum Nachweis wird hauptsächlich der Guajaktest verwendet, der die Peroxidaseaktivität des Hämoglobins in einer Farbreaktion nachweist (Imperiale et al., 2004). Der Test wird alle 2 Jahre durchgeführt.

Ab dem 55. Lebensjahr wird in Deutschland die Koloskopie (Darmspiegelung) in 10 jährigem Abstand durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein invasives Verfahren, bei dem auch Krebsvorstufen erkannt und sofort entfernt werden können. Die Koloskopie gilt als „Gold Standard“ in der Darmkrebsdiagnostik. Für Adenome einer Größe von 10 mm wird eine Sensitivität von 100% erzielt (Cotton et al., 2004). Allerdings ist die Akzeptanz in der Bevölkerung aufgrund von mit der Untersuchung verbundenen Unannehmlichkeiten gering. Nur etwa 18% der Männer und 47% der Frauen unterziehen sich im Rahmen der Krebsvorsorge einer Koloskopie (Deutsche Krebsgesellschaft).

Um die Akzeptanz und somit die Rate der Früherkennung zu erhöhen, wird derzeit an der Entwicklung alternativer, nichtinvasiver Verfahren zur Darmkrebsfrüherkennung gearbeitet.

Ein alternatives Verfahren ist die virtuelle Koloskopie (Computertomographie). Die erzielbare Sensitivität ist vergleichbar mit der Koloskopie, jedoch gilt die dabei entstehende Strahlenbelastung für einen Einsatz in der Darmkrebsfrüherkennung als zu hoch (dkfz: Krebsinformationsdienst, 2008).

Ein weiterer bereits kommerziell erhältlicher Test weist im Stuhl ein von Tumorzellen abgegebenes Peptid, die M2-Pyruvat-Kinase, mittels eines ELISAs nach (ScheBo® Biotech AG, Giessen, Deutschland). Die Sensitivität für Darmkrebs beträgt 85% (Haug et al., 2007), für Adenome jedoch nur 23% (Haug et al., 2008), weshalb der Test für den Einsatz in der Früherkennung nur bedingt geeignet ist.

Derzeit wird an der Entwicklung von weiteren, nichtinvasiven Tests gearbeitet, welche auf dem Nachweis von molekularen Markern basieren. Dabei bieten sich Stuhlproben als Medium an, da sie unbegrenzt zur Verfügung stehen und die Entnahme nichtinvasiv ist. Zudem kommt der Stuhl unmittelbar mit den Läsionen in Kontakt.

## **1.3 Molekulare Grundlagen**

### **1.3.1 Molekulare Stuhl-Marker in der Darmkrebsdiagnostik**

Die in Stuhlproben nachweisbaren Marker können über Neoplasien in das Darmlumen austreten, wie beispielsweise das mittels FOB-Test detektierte Hämoglobin. Eine höhere Spezifität zeigen

jedoch Marker, die von Tumorzellen oder Tumorstadiumszellen selbst abgegeben werden. Dazu gehören Peptide wie z. B. M2-Pyruvat-Kinase oder CEA (carcinoembryonic antigen) und für veränderte Zellen typische DNA-Marker.

### 1.3.2 DNA-basierte Marker

Eine wichtige Gruppe der von Neoplasien abgegebenen Marker bilden die DNA-basierten Marker. Dies können Genamplifikationen, Gentranslokationen, Veränderungen in der DNA-Methylierung, der Verlust der Heterozigosität und Punktmutationen sein (Osborn und Ahlquist, 2005). In 10 -15% der Fälle sind diese Veränderungen erblich (z. B. hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC), familial adenomatous polyposis (FAP)) (Houlston et al., 1992). Meistens treten die Veränderungen des Erbgutes jedoch sporadisch auf.

Besonders gut untersucht sind Mutationen innerhalb einzelner Gene. Eine Anzahl von Studien haben gezeigt, dass die Kolonkarzinogenese, die Entwicklung zum invasiven Tumor, ein gradueller, über Jahre andauernder Prozess ist, da Veränderungen in mehreren Genen dafür notwendig sind. Für die Früherkennung sind besonders die zu Beginn auftretenden Veränderungen interessant.

Der Übergang gutartiger Polypen des Dickdarms in maligne epitheliale Tumoren wird von Vogelstein und Kollegen als Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben (Abbildung 1.3, Fearon und Vogelstein, 1990). Danach tritt früh eine biallelische Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *APC* auf, gefolgt von der Mutation des Onkogens *K-ras* und der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *p53* am Übergang vom Adenom zum Karzinom.

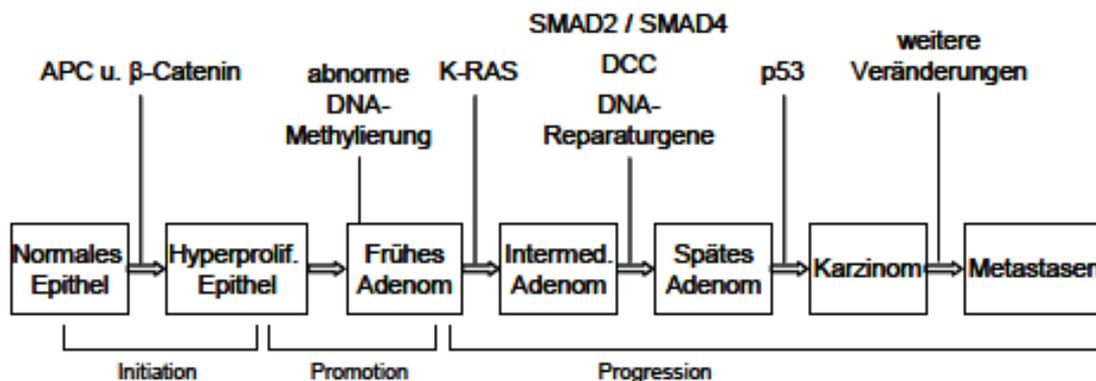


Abbildung 1.3: Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese mit genetischen Veränderungen und den Phasen der Krebsentstehung, nach Fearon und Vogelstein, 1990

Alternativ zu der Adenom-Karzinom-Sequenz wird ein anderer Entstehungsweg beschrieben, bei dem aus hyperplastischen Polypen serratierte Karzinome über serratierte Adenome entstehen (Longacre et al., 1990; Kambara et al., 2004; Jass, 2007). Auf molekularer Ebene sind für diese Karzinome Microsatelliteninstabilität (MSI), Mutationen von *BRAF / K-ras* und Hypermethylierung (Jass JR. 2007) charakteristisch, wobei Mutationen in den Genen *BRAF* und *K-ras* früh in der Entwicklung auftreten (Chan et al., 2003; Yang et al., 2004).

### 1.3.3 Tumor-DNA in Stuhl

Für die Verwendung von DNA-Markern zur Darmkrebsdiagnostik spricht deren Stabilität in Stuhlproben und die Möglichkeit der Analyse kleinster Mengen dieser Marker mittels Amplifikationstechniken (Osborn und Ahlquist, 2005).

Das gesunde Darmepithel ist ein schnell proliferierendes Gewebe, von dem ständig apoptotische Zellen abgeschliffert und mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Die Herausforderung des Nachweises der mutierten, aus neoplastischen Zellen stammenden DNA liegt in dem hohen Überschuss von nichtmutierter DNA aus gesunden Zellen in Stuhlproben.

Der Anteil von Tumor-DNA an der humanen Gesamt-DNA in Stuhlproben wurde in verschiedenen Studien bestimmt. Normalerweise ist die gastrointestinale Oberfläche zu weniger als 1% von Darmkrebs befallen. Neoplastische, nichtapoptotische Zellen, die nicht mehr einem kontrolliertem Zellwachstum unterliegen, werden jedoch in größerem Maße abgegeben als gesunde (Loganayagam, 2007). Eine teilweise höhere Ausscheidungsrate von neoplastischen Zellen ist auf Faktoren wie erhöhte Proliferation, verhältnismäßig geringe Apoptose und reduzierte Zell-Zell-Adhäsion zurückzuführen.

Der Anteil der aus Tumoren stammenden DNA liegt zwischen 0,4% und 24% (Traverso et al., 2002; Ahlquist et al., 2000). Ratto und Kollegen (1996) fanden, dass bei einer Tumorgroße von 1 cm<sup>3</sup> ca. 1% der humanen DNA im Stuhl aus dem Tumor stammt. Jen und Kollegen (1998) gehen von einem Anteil von 0,5% bis 5% mutierter DNA aus. Bei frühen Stufen kann der Anteil an Tumor-DNA unter 1% liegen (Whitney et al., 2004). Folglich muss eine Methode mit einem hohen relativen Detektionslimit verwendet werden.

## 1.4 Die Begriffe Sensitivität und Spezifität

Wichtige Parameter in der Diagnostik sind die Sensitivität und die Spezifität. Dabei muss unterschieden werden zwischen der technischen Leistungsfähigkeit eines diagnostischen Tests und den klinischen Ergebnissen. Um die Begriffe voneinander abzugrenzen, wird in dieser Arbeit die Formulierung „relatives Detektionslimit“ zur Beschreibung der technischen Eigenschaften verwendet. Klinische Spezifität und Sensitivität beziehen sich dagegen immer auf die Analyse von Patientenproben und sind ein Ergebnis der Summe aus biologisch-medizinischen Eigenschaften und technischer Leistungsfähigkeit des Tests.

### ***Relatives Detektionslimit***

Die Leistungsfähigkeit eines Assays wird auch durch sein relatives Detektionslimit bestimmt. Es gibt an, in welchem maximalen Verhältnis die mutierte DNA zu nicht mutierter DNA vorliegen darf, damit eine Detektion noch möglich ist. Es beschreibt die Fähigkeit des Assays zur Anreicherung mutierter DNA. Diese Eigenschaft ist von besonderer Bedeutung, da die Detektion mutierter DNA aus Körperflüssigkeiten immer in Anwesenheit großer Mengen nicht mutierter DNA erfolgt. Das relative Detektionslimit wird aus Mischungen von mutierter DNA mit nicht mutierter DNA in unterschiedlichen

Verhältnissen bestimmt. Dabei kann entweder die Menge mutierter DNA konstant und die Menge nicht mutierter DNA erhöht werden oder umgekehrt.

### ***Klinische Spezifität und Sensitivität***

Die klinische Spezifität eines medizinischen Tests gibt den Anteil der richtig als negativ (richtig-negativ) erkannten Proben an. Werden zum Beispiel mit einem diagnostischen Kit 10 % einer untersuchten Population fälschlicherweise „positiv“ getestet, obwohl sie keine Krankheit aufweisen, so besitzt der diagnostische Test eine Spezifität von 90 %. Dagegen beschreibt die klinische Sensitivität die Wahrscheinlichkeit, ein positives Ergebnis in einem medizinischen Test auch als solches zu erkennen (richtig-positiv). So gibt die Sensitivität bei einer medizinischen Untersuchungsmethode zur Erkennung einer Krankheit den Anteil der Kranken an, bei denen die Krankheit richtig erkannt wurde.

Klinische Spezifität und Sensitivität sind ein Ergebnis sowohl der medizinischen Eigenschaften des verwendeten Biomarkers als auch der technischen Leistungsfähigkeit des verwendeten Tests.

## **1.5 Methoden zur Detektion von Punktmutationen**

Die Identifizierung von Variationen einzelner Basenpaare im Genom ist für viele Forschungsbereiche von Bedeutung. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in nichtkodierenden Regionen werden beispielsweise zur Identifizierung von Individuen, in der Populationsgenetik und für Evolutionsstudien genutzt. SNPs in der kodierenden Region des Genoms können zu Veränderungen von Struktur oder Funktion von Proteinen führen und somit die Ursache von Erbkrankheiten sein. Die Analyse dieser SNPs wird zur Diagnose eingesetzt. Im Fall von Proteinen, die am Medikamentenmetabolismus beteiligt sind, spielen SNPs eine Rolle in der Pharmakogenetik. Missense SNPs bzw. Punktmutationen in Genen wie Apolipoprotein E und Faktor V Leiden Mutationen sind Ursachen für weitverbreitete Krankheiten. Variationen in den regulatorischen Regionen von Genen könnten Aussagen zu Risiken von Individuen ermöglichen, an bestimmten Krankheit zu erkranken (Syvänen, 2001). Auch Krebs ist eine genetische Erkrankung (Vogelstein et al., 2004), bei der Punktmutationen zur Diagnose, Prognose oder als prädiktive Marker für spezielle Therapien eine zunehmende Rolle spielen.

Von den genetischen und epigenetischen Veränderungen im Erbmateriale sind die Punktmutationen am schwierigsten nachzuweisen, da sie sich nur in einem einzigen Basenpaar von der Wildtyp-DNA unterscheiden. Dies erfordert besonders gut diskriminierende Verfahren. Eine ganze Reihe von Methoden wurden in der Vergangenheit zur Detektion von Punktmutationen oder auch SNPs entwickelt. Man kann diese Verfahren in zwei Kategorien unterteilen: Verfahren zur Detektion von unbekanntem und von bekannten Mutationen. Fast alle Verfahren beruhen auf einer vorangegangenen PCR zur Amplifikation des zu untersuchenden Genfragments.

### 1.5.1 Markerfindung (unbekannte Mutationen)

Um einen DNA-Marker zu identifizieren, müssen ganze Genabschnitte zunächst auf unbekannt Mutationen hin analysiert werden. Dafür geeignete Verfahren weisen eine geringere Sensitivität auf, weshalb als Probenmaterial meist Gewebeproben verwendet werden müssen.

Ein solches Verfahren ist die direkte Sequenzierung. Nach einer ersten PCR zur Anreicherung des zu untersuchenden Genfragmentes wird eine Sequenzier-PCR mit nur einem Primer durchgeführt. Neben den dNTPs werden Didesoxynukleotidtriphosphate eingesetzt, die bei Einbau zu einem Kettenabbruch führen (Sanger et al., 1977). Jedes der vier ddNTPs ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Die Analyse erfolgt mittels Kapillarelektrophorese und Fluoreszenzmessung. Eine Vorselektion von potentiell mutierten Fragmenten kann über SSCP oder dHPLC erfolgen (van Den Bosch et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Analyse unbekannter Mutationsstellen stellen enzymatische heteroduplexbasierte Methoden dar: MutS ist ein Enzym aus dem „mismatch repair“-System von *E.coli*. Es bindet an Heteroduplex-DNA und verhindert dadurch den Verdau der DNA durch die Exonuklease. Über die Länge des verbleibenden Fragments kann auf die Position der Mutation geschlossen werden. Dagegen wird reine Wildtyp-DNA komplett verdaut (Ellis et al., 1994). Ein anderes Verfahren nutzt eine aus Sellerie isolierte Nuklease aus dem DNA Reparatursystem, um heteroduplexe Nukleinsäuren zu schneiden. Homoduplexe Nukleinsäuren bleiben ungeschnitten. Die Analyse findet im Agarosegel statt (Surveyor mutation detection kit, Transgenomic, USA).

Bei dem Verfahren des DNA-Microarrays werden fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente an auf einer Oberfläche immobilisierte Oligonukleotide hybridisiert. Dabei können die Oligonukleotide jede Sequenzvariante abdecken (Hacia et al., 1998).

Eine spezielle Methode für die Detektion von Mutationen in Proteinen (z. B. APC) ist der Digital Protein truncation Test. Damit werden Verschiebungen des Leserasters und dadurch verkürzte und nicht mehr funktionsfähige Proteine detektiert. Dabei wird das PCR-Produkt der zu untersuchenden Region in vitro transkribiert und translatiert und die erhaltenen Proteine in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Trunkierte Proteine können so identifiziert werden. Da das Detektionslimit dieses Tests niedrig ist und 15% der Proteine mutiert vorliegen müssen, wurde die Methode dahingehend weiterentwickelt, dass nur wenige Ausgangsmoleküle pro Reaktion eingesetzt werden und die Reaktion wiederholt (144) durchgeführt wird (Traverso et al., 2002).

### 1.5.2 Detektion von bekannten Punktmutation

Ist eine Punktmutation bereits bekannt, können zu deren Analyse spezifischere Methoden eingesetzt werden. Dadurch ist ein höheres Detektionslimit erzielbar, und es können auch Proben wie Plasma oder Stuhl untersucht werden.

### **Allelspezifische Hybridisierungssonden**

Bei allen Varianten dieser Technologie werden Oligonukleotide benutzt, die im Bereich der Punktmutation hybridisieren. Basenfehlpaarungen führen dabei zu einer Verringerung der Schmelztemperatur des Sonden-Templat-Hybrids, was die Diskriminierung ermöglicht (Abbildung 1.4). Zur Analyse des Komplexes werden unterschiedliche Methoden eingesetzt. Ursprünglich wurde das Southern-blot-Verfahren angewendet, wobei die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen werden. Anschließend wird eine sequenzspezifische, radioaktiv-markierte Sonde hybridisiert (Villa et al., 1996). Eine Weiterentwicklung stellt das Hybridisierungsverfahren im Microtiterformat dar. Hierfür werden die PCR-Produkte über biotynilierte Primer an eine Streptavidin-beschichtete Oberfläche gebunden und denaturiert. An den einzelsträngigen DNA-Moleküle werden sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden hybridisiert. Inzwischen sehr weit verbreitet ist die DNA-Chip-Technologie, die ebenfalls auf dem sequenzspezifischen Hybridisierungsverfahren beruht.

Eine Schwierigkeit dieser Methode besteht in der benötigten Stringenz der Hybridisierungsbedingungen. Sind die Bedingungen nicht ausreichend optimiert, kommt es trotz Basenfehlpaarung zur Hybridisierung und somit zu falsch positiven Ergebnissen. Durch die Kommerzialisierung der Chip-Technologie ist das Verfahren zwar relativ preiswert und für Hochdurchsatz sehr gut geeignet. Da vor der Detektion jedoch keine Anreicherung erfolgt, ist die Methode ohne vorherige Schritte nicht sensitiv genug für die Detektion von Punktmutationen, die bei hohem Wildtypüberschuss vorliegen.

Ein Spezialfall ist die Verwendung von Hybridisierungssonden in der „realtime“-PCR. Hier werden fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt, die es ermöglichen, die Zunahme der PCR-Produktmenge während der Reaktion zu verfolgen. Im Falle von FRET- Hybridisierungssonden werden zwei Sonden eingesetzt, die benachbart auf dem DNA-Strang binden müssen, um einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zu erzeugen (Abbildung 1.5). Die Signalerzeugung durch FRET beruht darauf, dass der Farbstoff der Donor-Sonde Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, welches den benachbarten zweiten Farbstoff anregt. Dieser emittiert dann Licht einer höheren Wellenlänge als die Donor-Sonde. Am Ende der PCR erfolgt eine langsame Temperaturerhöhung während die Fluoreszenz ständig gemessen wird. Durch die Dissoziation der Sonden nimmt die Fluoreszenz ab. Eine Basenfehlpaarung zwischen PCR-Produkt und Hybridisierungssonde führt zu einer Destabilisierung der Bindung und somit zu einem Fluoreszenzabfall bei niedrigerer Temperatur. Die erste negative Ableitung der Fluoreszenzänderung über die Temperatur ( $-dF/dT$ ) zeigt den Schmelzpunkt der DNA als Maximum. Bei der Verwendung von Taqman-Sonden wird die 5'-3' – Exonukleasefunktion der Polymerase genutzt, um die auf dem zu synthetisieren Strang gebundene Sonde zu hydrolysieren. Dabei werden der am 5'-Ende der Sonde befindliche Fluoreszenzfarbstoff von dem am 3'-Ende befindlichen Quencher getrennt, und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal (Abbildung 1.6). Unter sehr stringenten Bedingungen wird die Bindung der Sonde im Falle einer Basenfehlpaarung verhindert und es entsteht kein Signal.

Ein Vorteil ist, dass keine Separationsschritte nach der PCR erfolgen müssen. Die Detektion erfolgt direkt im PCR-Ansatz. Multiplexierung ist jedoch nur bedingt möglich und das zu erzielende Detektionslimit beträgt 1:10 bis maximal 1:100 bei Verwendung von speziellen MGB-Sonden (minor groove binder – Sonden, Itabashi et al., 2004).

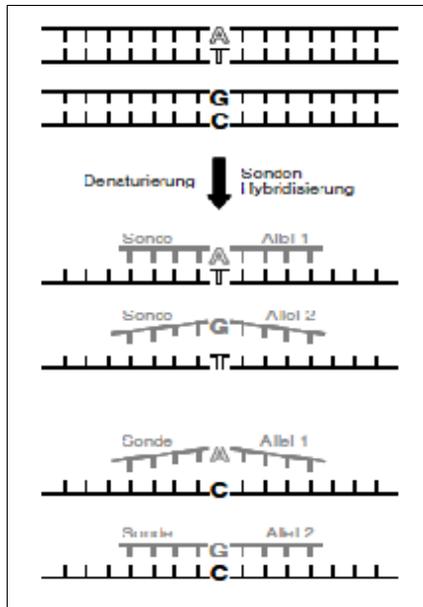


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer allelspezifischen Hybridisierung

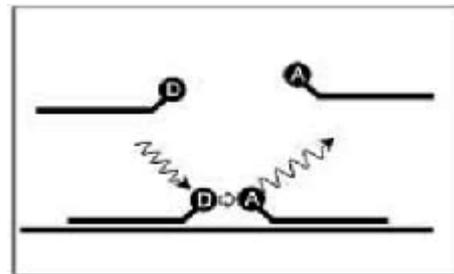


Abbildung 1.5: Funktionsprinzip FRET-Hybridisierungssonden

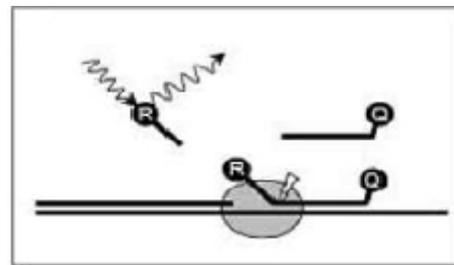


Abbildung 1.6: Funktionsprinzip Taqman-Sonde

### Heteroduplexanalyse

Die Heteroduplexanalyse basiert auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität von Homoduplex- und Heteroduplex-DNA (Abbildung 1.7). Vor der Analyse werden die aus der Mischung von Wildtyp- und mutierten Fragmenten erhaltenen PCR-Produkte denaturiert und rehybridisiert. Die erhaltenen Homo- und Heteroduplexe können in einem Acrylamidgel aufgetrennt werden. Die nicht sichtbare Heteroduplexbande, die in Höhe einer Positivkontrolle läuft, wird ausgeschnitten, aufgereinigt und in eine zweite PCR eingesetzt. Die Detektion der Mutation erfolgt über Sequenzierung (Deuter und Müller, 1998). Das bedeutendere Verfahren ist jedoch die Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC). Die entstehenden Homo- und Heteroduplexe können mit einer Ion-Pair Reversed-Phase Chromatographie-Säule und einer adäquaten mobilen Phase aufgetrennt werden. Bei einer Temperatur der mobilen Phase von annähernd denaturierenden Bedingungen und einem linearen Gradienten eines polaren Lösungsmittels werden Heteroduplexmoleküle früher als Homoduplexmoleküle von der Chromatographiesäule eluiert und dadurch eine Genotypisierung ermöglicht. Mit dieser Methode können auch unbekannte Mutationen detektiert werden (van Den Bosch et al., 2000). Die Technologie ist zwar gut automatisierbar, erreicht jedoch lediglich ein Detektionslimit von 1:5 (Xiao et al., 2001).

### Konformationsbasierte Methoden

Konformationsbasierte Methoden sind die SSCP (Single strand conformation polymorphism) und die Ce-SSCP (Capillarelectrophorese-Single strand conformation polymorphism). Hierbei erfolgt die Diskriminierung aufgrund verschiedener Sekundärstrukturen von einzelsträngigen PCR-Produkten, die sich in einer oder mehreren Basen unterscheiden. PCR-Produkte werden denaturiert und in einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität lassen auf vorhandene Mutationen schließen (Shi, 2001) (Abbildung 1.8).

Es handelt sich um eine kostengünstige Methode, die aber aufgrund viele Arbeitsschritte nicht für den Hochdurchsatz geeignet ist.

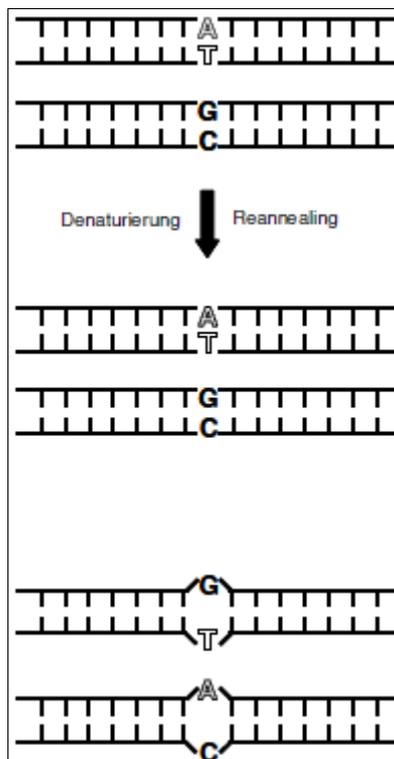


Abbildung 1.7: Funktionsprinzip der dHPLC-Analyse

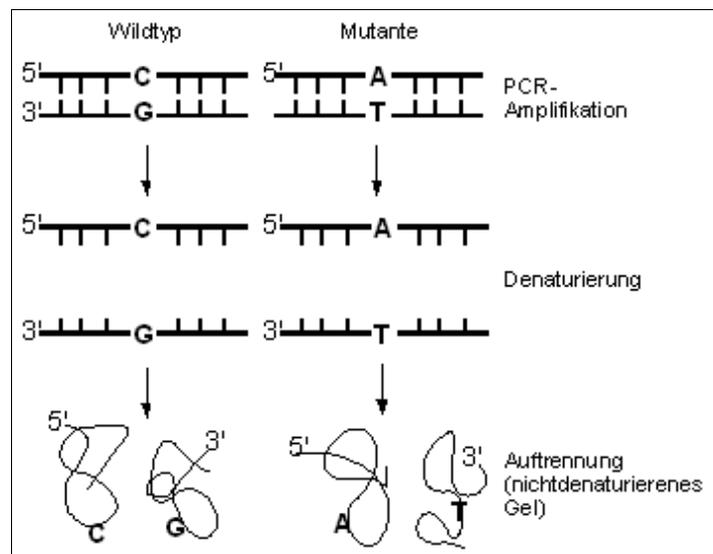


Abbildung 1.8: Funktionsprinzip der SSCP-Analyse

### Minisequenzierung

Das Verfahren der Minisequenzierung ist auch unter den Begriffen „single nucleotide Primer extension“ (SnPE) oder „single base extension“ (SBE) bekannt. Es beruht auf dem exakten Nukleotideinbau durch eine DNA-Polymerase (Abbildung 1.9). Genfragmente werden mit einem biotinylierten Primer amplifiziert und immobilisiert. Anschließend werden die PCR-Produkte denaturiert und mit einem Primer direkt vor dem zu untersuchenden Polymorphismus hybridisiert. In einer Sequenzierreaktion wird der Primer um genau ein markiertes Didesoxynukleotid verlängert. Die Markierung kann radioaktiv oder Didesoxygenin aber auch ein Fluoreszenzfarbstoff sein. Die Detektion erfolgt in Mikrotiterplatten (Syvänen et al., 1991). Bei der Verwendung von für jede Base verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kann die Detektion über ein DNA-Sequenziersystem erfolgen.

Auch die Detektion aufgrund unterschiedlicher Massen im MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) ist möglich (Ross et al., 1998). Das System ist sehr gut für Hochdurchsatz geeignet, der Aufwand für Assaydesign und Optimierung ist gering. Bei Verwendung nur eines der vier Nukleotide pro Sequenzierreaktion kann ein Detektionslimit von 1% erzielt werden (Kann et al, 2006).

Bei der Pyrosequenzierung handelt es sich ebenfalls um ein Minisequenzierverfahren. Das bei dem Einbau eines Didesoxynukleotidtriphosphats freigesetzte Pyrophosphat führt über eine Enzymkaskade zur Emission eines Lichtblitzes (Ahmadian et al., 2000). Das Verfahren ist durch seine Automatisierbarkeit für den Hochdurchsatz geeignet. Das Detektionslimit beträgt 10% (Bäumler, 2004).

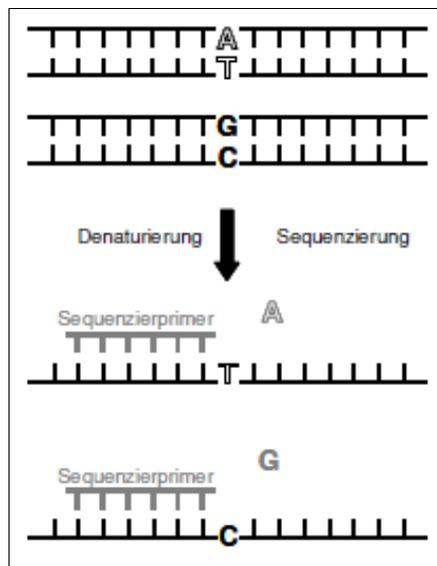


Abbildung 1.9: Funktionsprinzip der Minisequenzierung

### **Oligonukleotidligation**

Bei der Ligase detection reaction (LDR) werden auf dem einzelsträngigen PCR-Produkt zwei Oligonukleotide hybridisiert. Das 3'-Ende des einen enthält die mutierte Base. Nur wenn die Base auf dem DNA-Strang keine Basenfehlpaarung bildet, werden die beiden Oligonukleotide durch T4-Ligase ligiert (Abbildung 1.10). Durch den Einsatz eines Blockingoligomers, welches dem Wildtyp entspricht, wird die Sensitivität noch erhöht. Die Detektion erfolgt über die Länge der ligierten bzw. unligierten Oligonukleotide im Polyacrylamidgel (Jen et al., 1994), oder es werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide verwendet, die mittels Kapillarelektrophorese analysiert werden (Turner et al., 2005). Die Methode wurde 1998 von Jen und Kollegen in Stuhlproben angewendet.

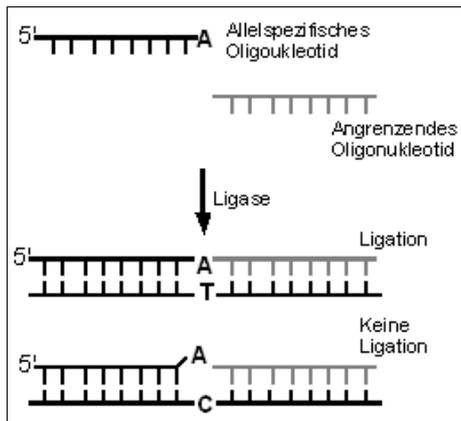


Abbildung 1.10: Funktionsprinzip der Oligonukleotidligation

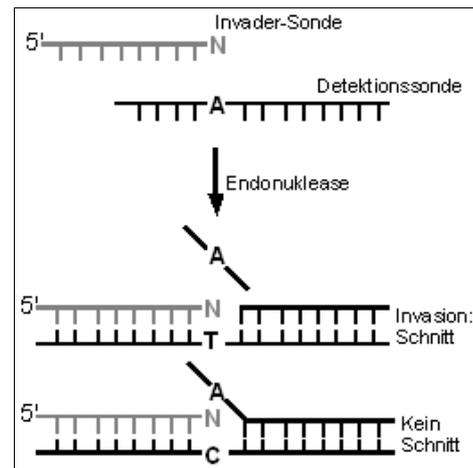


Abbildung 1.11: Funktionsprinzip des Invader-Verfahrens

### Invader-Verfahren

Auf dem zu analysierenden DNA-Strang werden zwei Oligonukleotidsonden hybridisiert. Die beiden Sonden überlappen. Dies ist die Erkennungsstruktur für ein Enzym, welches die überlappende Sequenz der downstream-Sonde (= Detektionssonde) schneidet. Dabei darf die erste überlappende Base der downstream-Sonde keine Basenfehlpaarung bilden. Bei einer Basenfehlpaarung, also beispielsweise wenn eine Wildtypsequenz vorliegt, bleibt die Detektionssonde ungeschnitten (Abbildung 1.11). Eine Amplifikation des Signals erfolgt durch wiederholtes Schneiden. Dadurch kann die Methode auch ohne vorherige PCR angewendet werden. Es kann ein Detektionslimit von 1:1000 erzielt werden (Kwiatkowski et al., 1999). Allerdings werden große Mengen an Templat-DNA benötigt (Sv Vänen, 2001).

### Restriktionsenzyme

Auf der Verwendung von Restriktionsenzymen basiert die PCR-RFLP (PCR-restriction length polymorphism). Das Genfragment wird mittels PCR amplifiziert und mit einem Restriktionsenzym, für das eines der Allele die Erkennungssequenz trägt, inkubiert (Abbildung 1.12). Die Identifizierung der Mutanten erfolgt anhand der Größe im Agarosegel. Eine spezielle Anwendung ist die mutant enriched PCR für *K-ras*. In einer ersten PCR wird mit einem einen Basenaustausch einführenden Primer in Wildtyp-Fragmenten eine Restriktionsschnittstelle für *Bst*NI erzeugt. Ein anschließender Restriktionsverdau schneidet den Wildtyp und lässt die Mutante ungeschnitten. Diese wird in einer 2. nested PCR nochmals selektiv amplifiziert. Die Detektion erfolgt

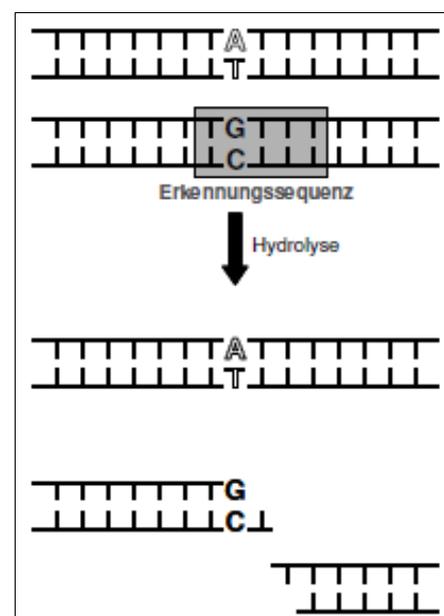


Abbildung 1.12: Funktionsprinzip der RFLP-Analyse

mittels DNA-ELISA, bei dem die angereicherten mutierten Fragmente mit spezifischen Sonden hybridisiert werden (Haug et al., 2007). Dieses Verfahren kommt bei dem kommerziell erhältlichen Kit der Firma Invitek (Berlin) zum Einsatz. Ein weiteres auf Restriktionsenzymen beruhendes, speziell für die Detektion von *K-ras* entwickeltes Verfahren stellt SAMA („stencil-aided mutation analysis“) dar. Vor der PCR erfolgt eine Reduktion des Wildtyp-Fragments. Dazu wird das *K-ras*-Genfragment mit einem Überschuss an Oligonukleotid vermischt, welches die AluI-Schnittstelle unmittelbar vor dem Codon 12 und das Codon 12 selbst überspannt („stencil“). Mit in Codon 12 mutierten Genfragmenten bildet der Stencil eine Basenfehlpaarung und hybridisiert nicht bei den gegebenen Temperaturen. Anschließend erfolgt der Verdau des Wildtyps mit AluI. Diese Anreicherung kann auch bei anderen Genfragmenten angewendet werden (Lichtenstein et al., 2001).

Bei den Methoden mit Einsatz von Restriktionsenzymen sind viele Arbeitsschritte notwendig und eine computergestützte Auswertung ist nicht möglich. Sie sind deshalb nicht für den Hochdurchsatz geeignet.

### **1.5.3 Verfahren mit hohem Detektionslimit**

Die Genauigkeit von auf DNA-Markern basierenden diagnostischen Tests setzt sich aus biologischen und technischen Faktoren zusammen. Sensitivität und Spezifität ist zum einen von dem Markerset und zum anderen von der Möglichkeit der zur Detektion verwendeten Methode abhängig, kleinste Mengen DNA auf tumorspezifische Änderungen zu untersuchen. Für die Detektion von Mutationen in Proben mit einem hohen Überschuss an Wildtyp-DNA wurden spezielle Verfahren entwickelt.

#### ***Digital PCR***

Bei der Digital PCR wird die DNA soweit verdünnt, dass pro Reaktion theoretisch nur ein Molekül vorhanden ist. Pro Probe werden 288 Reaktionen in einer Multititerplatte durchgeführt. Anschließend wird eine Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden durchgeführt. Dabei werden zwei unterschiedlich markierte Sonden verwendet: eine, die jedes PCR-Produkt detektiert, und eine weitere, welche der Wildtypsequenz entspricht. Das Verhältnis der beiden Fluoreszenzsignale wird analysiert (Vogelstein und Kinzler, 1999).

#### ***BEAMing***

Eine Weiterentwicklung der digital PCR stellt BEAMing („beads, emulsion, amplification and magnetics“) dar. In einer ersten PCR wird das zu untersuchende Genfragment amplifiziert. Anschließend werden die PCR-Produkte mit magnetischen „beads“ gemischt, an die ein Oligonukleotid komplementär zu Sequenzabschnitten der PCR-Produkte gebunden ist. Aus dieser Mischung wird eine Wasser-in-Öl-Emulsion mit Milliarden von Mikrokompartimenten hergestellt, die teilweise sowohl ein DNA-Molekül als auch einen „bead“ enthalten. In einer zweiten PCR wird das DNA-Molekül amplifiziert und dabei an den „bead“ gebunden. Dieser „bead“ enthält nun

zehntausende Kopien eines einzelnen DNA-Moleküls. An den an die „beads“ gebundenen Strängen wird eine „single base extension“ mit je zwei (dem Wildtyp und der Mutante entsprechenden) unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durchgeführt. Die Auswertung erfolgt mittels Durchfluss-Zytometrie (Diehl et al., 2005; Diehl et al., 2008).

### **Allelspezifische PCR**

Bei dieser Methode erfolgt bereits während der PCR eine Anreicherung der die Punktmutation tragenden Gensequenz. Das 3'-Ende des einen Primers entspricht der zu detektierenden Mutation und unter optimierten Bedingungen entsteht nur bei korrekter Basenpaarung ein PCR-Produkt. Wildtyp-Fragmente werden nicht amplifiziert (Abbildung 1.13). Die verwendete Polymerase enthält keine 3'-Exonuklease-Aktivität (Hasegawa et al., 1995; Smith-Ravin et al., 1995). Das Verfahren erfordert allerdings eine sehr aufwendige Optimierung, da ansonsten trotz der Basenfehlpaarung PCR-Produkte entstehen, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen (Oldenburg et al., 2008). Diese Amplifikate tragen dann die vom Primer mitgebrachte, der mutierten Sequenz entsprechende Base. Eine spezielle Form der AS-PCR, die die Möglichkeit der Amplifikation bei Basenfehlpaarung ausschließt, stellt die proofreading PCR dar. Am 3'-Ende des Primers befindet sich ein nicht verlängerbares Nukleotid. Befindet sich an dieser Position eine Mutation, die eine Basenfehlpaarung verursacht, wird das Nukleotid aufgrund der „proofreading“-Funktion einer Polymerase mit Exonukleaseaktivität abgetrennt und eine Primerverlängerung kann stattfinden (Wegmüller et al., 1995; Bi und Stambrook, 1998). Das zu erzielende Detektionslimit liegt laut Wegmüller und Kollegen (1995) bei 1:1000 bis 1:10 000.

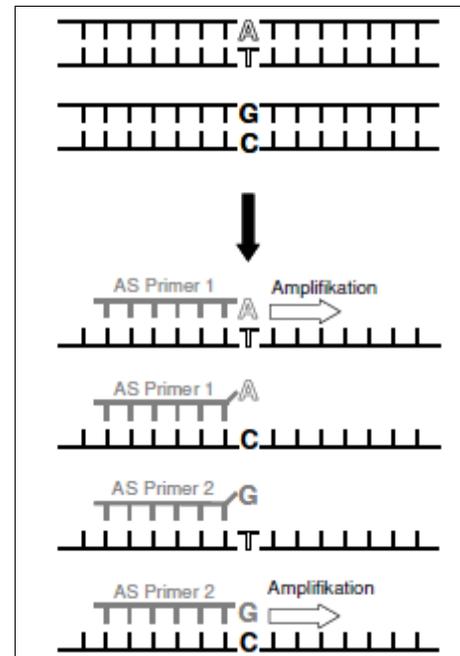


Abbildung 1.13: Funktionsprinzip einer allelspezifischen PCR

### **Clamp-PCR**

Die Clamp-PCR oder WTB-PCR („wildtyp blocking“-PCR) ist eine weitere Methode, bei der schon während der PCR eine Anreicherung des zu detektierenden mutierten Genfragments stattfindet. Die Bindung des Primers an dem Wildtyp (Thiede et al., 1996; Rhodes et al., 1997) oder die Amplifikation des Wildtyps (Orum et al., 1994; Behn et al., 2000) wird verhindert, indem ein der Wildtypsequenz entsprechendes Oligonukleotid eingesetzt wird, welches an dem Wildtypstrang bindet und so als Blocker fungiert. Als Blocker werden die Nukleotidanaloga PNA (peptide nucleic acid) (Thiede et al., 1996) oder LNA (locked nucleic acid) (Dominguez et al., 2005; Senescau et al., 2005) verwendet. Diese Nukleotidanaloga hybridisieren mit höherer Affinität an DNA-Doppelhelices als an DNA-Oligomeren.

Im Gegensatz zur allelspezifischen PCR besteht bei dieser Methode nicht die Gefahr der Erzeugung

falsch-positiver Produkte. Es werden erzielbare Detektionslimits von 1:1000 bis 1:10 000 beschrieben. Nachteilig bei der Verwendung von PNA sind die hohen Kosten. LNA ist im Zusammenhang mit dieser Technologie bisher nicht sehr weit verbreitet und die Eigenschaften der Methode wenig erforscht. Es handelt sich jedoch um eine viel versprechende Methode, mit der man ein hohes Detektionslimit erzielen kann und das nur wenige Arbeitsschritte erfordert. Dadurch verringert sich die Fehleranfälligkeit.

## 1.6 Aufgabenstellung

Im Rahmen einer BMBF-Fördermaßnahme (BioProfile Nutrigenomik) soll ein nichtinvasiver Test zum Nachweis von humanem Darmkrebs im Frühstadium entwickelt werden. Dieser Nachweis soll anhand von DNA-Markern erfolgen, die in Stuhlproben der Patienten zu detektieren sind. In einer Vorstudie wurden für den Nachweis vier verschiedene Markergensequenzen identifiziert. Es handelt sich dabei neben Deletionen und Insertionen vorwiegend um Punktmutationen in den Gensequenzen.

Aufgabe dieser Arbeit war es, eine Methode zur Detektion dieser Punktmutationen zu entwickeln. Die besondere Herausforderung bestand in dem Verhältnis, in dem mutierte zu nichtmutierten DNA-Fragmenten in Stuhlproben vorliegen. Die üblichen Verfahren zur Analyse von Punktmutationen oder „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) erreichen Detektionslimits im Bereich von einer mutierten Kopie in zehn Wildtypkopien. Weiterentwickelte Methoden beschreiben Detektionslimits von 1 zu 100 und teilweise mehr. Letztere Methoden sind oft sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv. Ziel war es eine Methode zu etablieren, die mit wenigen Arbeitsschritten eine Detektion von im Unterschuss vorliegenden Mutationen erlaubt. Es wird ein Detektionslimit von mindestens 1:1000 angestrebt, da Literaturdaten dieses Verhältnis für Tumor-DNA zu gesunder DNA in Stuhlproben angeben (Whitney et al.,v 2004). Dabei soll die Methode kostengünstig und leicht automatisierbar sein, um in einem routinemäßig eingesetzten Nachweissystem angewendet werden zu können. Ein weiteres Kriterium ist die Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen.

Es sollen verschiedene Methoden zum Nachweis vom im Unterschuss vorliegenden Punktmutationen auf ihre Funktionalität überprüft werden. Das geeignetste Verfahren soll anschließend für die zuvor identifizierten DNA-Marker etabliert werden, um eine Anwendbarkeit in dem zu entwickelnden Nachweissystem zu demonstrieren. Es soll auch die Universalität des Verfahrens in Hinblick auf unterschiedliche Punktmutationen gezeigt werden.

## 2 Rahmenprojekt

### Entwicklung eines nichtinvasiven Nachweissystems zur Früherkennung von humanem Darmkrebs

Diese Arbeit entstand als Kooperation des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie der Universität Potsdam mit der Firma Biotecon Diagnostics GmbH im Rahmen einer BMBF-Fördermaßnahme (BioProfile Nutrigenomik). Ziel des Projektes ist die Entwicklung eines nichtinvasiven Nachweissystems für humanen Darmkrebs im Frühstadium. Das Projekt setzt sich aus zwei Teilbereichen zusammen: die Erstellung eines Markersets mittels Mutationsscreening an Gewebeproben und die Etablierung einer Methode zum Nachweis der darmkrebsrelevanten Mutationen in Stuhlproben.

Um DNA-Marker für die Diagnostik einsetzen zu können, reicht die zu erzielende Sensitivität durch die Betrachtung von Mutationen in einem einzelnen Gen nicht aus. Eine hohe Sensitivität kann nur erreicht werden, wenn mehrere Gene zu einem Markerset zusammengefasst werden (Osborn und Ahlquist, 2005).

Es wurden bisher eine Reihe von Multitarget-Assays für die Analyse von Stuhlproben entwickelt. Viele davon basieren, wie das präkommerzielle Nachweissystem der Firma EXACT Sciences (Massachusetts, USA), auf der Kombination des Nachweises von Mutationen in *APC*, *K-ras* und *p53*, mit einer Analyse der „microsatellite instability“ (MSI) und der DNA-Integrität. Damit konnten für Karzinome Sensitivitäten von 62% - 91% und für Adenome von 27% - 82% erzielt werden. Die mit diesen Markern zu erzielende Spezifität liegt zwischen 93% und 97%. Die Anzahl der Patienten in den verschiedenen Studien war jedoch nur gering (22 bis 65 Personen mit Karzinomen bzw. 11 bis 28 Personen mit Adenomen). Zudem liegt der Preis für das Nachweissystem mit 700 - 800\$ relativ hoch (Osborn und Ahlquist, 2005).

Ziel des ersten Teils dieses Projektes war es, ein Markerset mit hoher Sensitivität und Spezifität zu erstellen. Für ein möglichst kostengünstiges Nachweissystem sollten eine kleine Anzahl von Genmarkern verwendet werden.

#### 2.1 Biologische Grundlagen zur Erstellung eines Markersets

Bei Darmkrebsvorstufen werden zwei Signaltransduktionswege häufig als mutiert beschrieben: der Wnt-Signaltransduktionsweg (Abbildung 2.1), der Zell-Adhäsion und Zell-Migration, reguliert und der Ras-Raf-MEK-MAPK-Signaltransduktionsweg (Abbildung 2.2), der Zellteilung und Zellentwicklung kontrolliert (Steinberg und Scholtka, 2004). Aus jedem Signalweg werden Fragmente zwei häufig veränderter Gene untersucht, deren Mutationen sich meist gegenseitig ausschließen (Morin et al., 1997; Dashwood et al., 1998), da sie den gleichen Effekt haben, nämlich die Aktivierung des Signalweges. Alle vier betrachteten Gene werden bereits früh in der Karzinogenese als mutiert

beschrieben (Fearon und Vogelstein, 1990; Powell et al., 1992; Kambara et al., 2004; Beach et al., 2005).

### 2.1.1 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signaltransduktionsweg führt bei Aktivierung zur Expression von Genen mit proliferationssteigernden Effekten. In Abwesenheit des Wnt-Signals wird  $\beta$ -Catenin in einem Komplex mit APC und anderen Proteinen phosphoryliert und anschließend durch Ubiquitin degradiert. Nach Aktivierung des Signalweges durch Wnt wird die Bindung von  $\beta$ -Catenin an den Komplex und somit dessen Degradation verhindert.

APC ist ein Tumorsupressorgen, welches in Exon 15 eine Mutation-Cluster-Region aufweist (Friedrich und Kullmann, 2003). Das APC-Gen liegt laut verschiedener Studien an Darmtumoren zu 30 – 80% mutiert vor (Wang et al., 2004; Conlin et al., 2005; Lüchtenborg et al., 2005; Diergaard et al., 2003; Traverso et al., 2002; Rowan et al., 2000). Deletionen oder Insertionen führen zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zu einem trunkierten Protein (Kakiuchi et al., 1995; Laurent-Puig et al., 1998). Dieses verkürzte Protein ist nicht mehr in der Lage, die Menge des in der Zelle vorhandene  $\beta$ -Catenins zu regulieren (Sparks et al., 1998).

Alternativ kann im Wnt-Signalweg laut Sparks und Kollegen (1998) auch das Gen CTNNB1, welches für das Protein  $\beta$ -Catenin codiert, mutiert sein.  $\beta$ -Catenin bildet im Zellkern einen Komplex mit TCF, der als Transkriptionsfaktor fungiert und die Expression von Zielgenen startet, was zu Zellteilung führt. Mutationen des Onkogens treten gehäuft an Positionen in Exon 3 auf, die direkt für bedeutende Phosphorylierungsstellen kodieren bzw. diese flankieren, was eine Störung der Degradierung des  $\beta$ -Catenin-Proteins zur Folge hat (Tsukamoto et al., 2000).  $\beta$ -Catenin häuft sich im Zellkern an und führt zu einer vermehrten Transkription von Zielgenen. Das  $\beta$ -Catenin-Gen wird in 48% der humanen Kolonkarzinomen als mutiert beschrieben (Sparks et al., 1998). In neueren Studien wurden allerdings geringere Mutationshäufigkeiten festgestellt (Lüchtenborg et al., 2005; Fukushima et al. 2001).

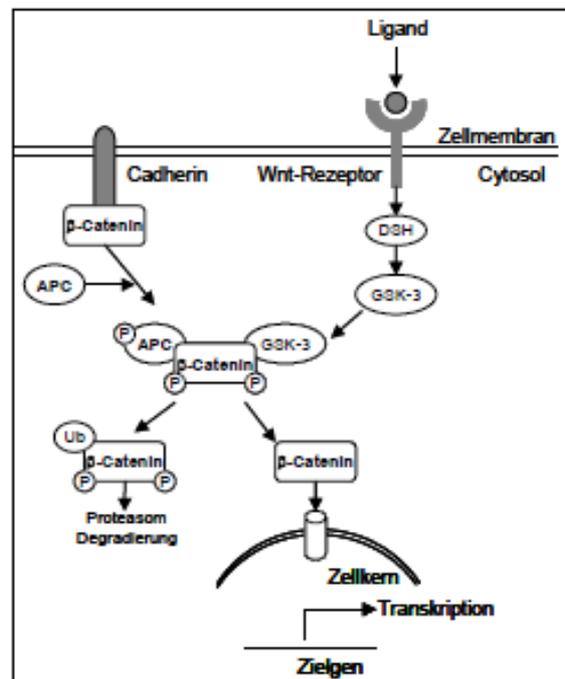


Abbildung 2.1: Der Wnt-Signaltransduktionsweg

## 2.1.2 Der Ras-Raf-MEK-MAPK-Signalweg

Der Ras-Raf-MEK-MAPK-Signaltransduktionsweg führt bei Stimulierung durch Wachstumsfaktoren zu einer Zellteilung. Dabei wird das an der inneren Membran gebundene G-Protein K-ras durch eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase aktiviert. Es ändert seine inaktive an GDP gebundene zur aktiven an GTP gebundenen Form. Dadurch werden RAF-Proteine aus dem Cytosol an der Membran gebunden und aktiviert. Weitere Phosphorylierungen in der Kaskade führen zur Aktivierung von ERK.

Der Ras-Raf-MEK-MAPK-Signaltransduktionsweg wird in 30% aller Krebserkrankungen aktiviert (Garnett et al., 2004). Das *K-ras*-Gen, dessen Produkt Teil des MAPK-Signalweges (Abb. 1.4) ist, weist eine Häufung von aktivierenden Mutationen in den Codons 12, 13, 59 und 61 (Bos et al., 1987) auf. Es ist zu 10 – 15% in Adenomen < 1 cm, zu 30 – 60% in Adenomen > 1 cm (Brink et al., 2003) und in 30-40% der Fälle von Darmkrebskarzinomen mutiert (Dong et al., 2001; Calistri et al., 2003 und 2005; Fransen et al., 2004; Wang et al., 2004; Lüchtenborg et al., 2005). Mutiertes K-ras verbleibt in der aktivierten Form.

BRAF kodiert für eine Serin-Threonin-Kinase, die die Funktion anderer Proteine moduliert, indem es eine Phosphatgruppe überträgt. Es wird selbst durch Phosphorylierung aktiviert (Pollock und Meltzer, 2002). Die Veränderung an Position 600 von Valin zu Glutamat bewirkt die Nachahmung der Phosphorylierung von Threonin 598 und Serin 601 und somit die Daueraktivierung. BRAF liegt in 5 – 22% der Darmtumore mutiert vor (Garnett et al., 2004). Die häufigste in Darmkrebs vorkommende Mutation ist in Codon 600 zu finden und bewirkt eine dauerhafte Aktivierung des Gens (Garnett et al., 2004). BRAF Mutationen treten nicht gemeinsam mit K-ras Mutationen auf und sind in der gleichen Phase der Kanzerogenese mutiert (Rajagopalan et al., 2002).

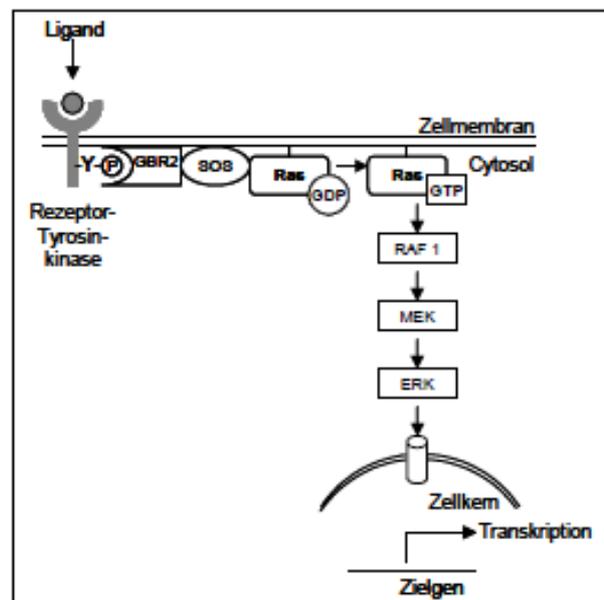


Abbildung 2.2: Der Ras-Raf-MEK-MAPK-Signaltransduktionsweg

## 2.2 Mutationsscreening zur Erstellung des Markersets

Zur Erstellung des Markersets wurden mittels Biopsie im Rahmen von Koloskopien gewonnene Darmgewebeproben auf Mutationen untersucht.

Es wurden 173 Gewebeproben auf Mutationen in den Genen *APC*, *CTNNB1*, *K-ras* und *BRAF* untersucht. Für die Analyse der Genfragmente *CTNNB1* und *BRAF* wurde die „single strand conformation polymorphism“ (SSCP) Methode und für *K-ras* die RFLP-Analyse verwendet. Diese Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Steinberg an der Universität Potsdam durchgeführt. Die *APC*-Genfragmente wurden von der Verfasserin dieser Arbeit mittels Sequenzierung analysiert. Die Ergebnisse des Mutationsscreenings sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 zusammengefasst.

Stadium	Anteil Mutationen	Anteil Mutationen in %
Adenokarzinom	55 / 72	76,4
Adenom	38 / 54	70,4
Hyperplastischer Polyp	19 / 25	76,0
Vorstufen (Adenom bzw. Hyperplastischer Polyp)	57 / 79	72,2
Unauffälliger Befund	4 / 17	23,5

Tabelle 2.1: Ergebnisse des Mutationsscreenings unterteilt nach Stadien

Stadium	<i>APC</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>K-ras</i>	<i>BRAF</i>
Adenokarzinom	44,8 % (30 / 67)	8,3 % (6 / 72)	28,6 % (20 / 70)	18,1 % (13 / 72)
Adenom	31,8 % (14 / 44)	14,0 % (8 / 57)	20,0 % (10 / 50)	33,3 % (18 / 54)
Hyperplastischer Polyp	9,5 % (2 / 21)	3,8 % (1 / 26)	29,2 % (7 / 24)	52,2 % (12 / 23)
Vorstufen (Adenom bzw. Hyperplastischer Polyp)	24,6 % (16 / 65)	10,8% (9 / 83)	23,0% (17 / 74)	39,0% (30 / 77)
Unauffälliger Befund	0 % (0 / 16)	5,9 % (1 / 17)	17,6 % (3 / 17)	11,8 % (2 / 17)

Tabelle 2.2: Anteil der Mutationen für die einzelnen Gene

In je drei Fällen der 173 untersuchten Proben (1,7%) waren *APC* und *CTNNB1* bzw. *K-ras* und *BRAF* gleichzeitig mutiert. In 25 Fällen (14,5%) traten Mutationen in beiden Signalwegen auf.

Mit dem Markerset konnte in den untersuchten Proben für die für die Frühdiagnostik relevanten Stufen (Adenome und hyperplastische Polypen) eine Sensitivität von 72,2% erzielt werden. Adenokarzinome wurden mit einer Sensitivität von 76,4% detektiert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 „Realtime“-PCR

Zur Etablierung der Methoden wurde in dieser Arbeit die „realtime“-PCR-Technologie verwendet. Die in diesem Zusammenhang wichtigen Grundlagen werden in folgendem Abschnitt kurz erläutert.

In einer „realtime“-PCR wird, im Gegensatz zur konventionellen PCR, die Anzahl der entstandenen Kopien nach jedem Zyklus gemessen. Die Messung kann mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe, wie z. B. SYBR-Green, erfolgen. SYBR-Green bindet nur an doppelsträngige DNA und ändert dabei sein Emissionsmaximum. Bei der Wellenlänge von 530 nm kann die Zunahme von doppelsträngiger DNA verfolgt werden. Mit Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden werden dagegen Signale erzeugt, die auf der sequenzspezifischen Bindung an die Ziel-DNA beruhen. In beiden Detektionsverfahren wird eine Mindestmenge DNA benötigt, bevor ein Signal vor dem Hintergrundsignal detektiert werden kann. Das detektierbare Signal wird mit etwa  $10^{10}$  -  $10^{11}$  Kopien erreicht. Sobald diese Anzahl an DNA-Molekülen überschritten wird, kann entsprechend der PCR-Kinetik ein exponentieller Anstieg des Signals beobachtet werden (exponentielle Phase). Nach einer Übergangsphase nähert sich die Fluoreszenz einem Maximum an. Als Signalgrenzwert („threshold“) wird ein Fluoreszenz-Wert definiert, der etwa der 10fachen Standardabweichung des Hintergrundsignals entspricht. Der Moment des Überschreitens des Signalgrenzwertes wird als Durchbruchzyklus „cycle threshold“ (CT) oder auch „crossing point“ (CP) bezeichnet. Idealerweise verdoppelt sich die Menge des PCR-Produkts in jedem Zyklus, d.h. die Menge nimmt exponentiell zu.

$$N = N_0 \times 2^z$$

$N$  = Produktmenge,  $N_0$  = Ausgangsmenge des Templats,  $z$  = Zyklenzahl

Daher bedeutet ein um 1 größerer CT-Wert halb so viel Ausgangs-DNA. Allgemein gilt ein um  $x$  größerer CT-Wert =  $2^x$  weniger Ausgangs-DNA. Bei einer CT-Wert-Differenz von 3,3 beträgt der Unterschied der Ausgangs-DNA-Menge das 10fache.

#### 3.1.1 Verwendete Detektionsverfahren in der „realtime“-PCR

Alle „realtime“-PCR-Systeme beruhen auf der kontinuierlichen Messung eines Fluoreszenz-Signals, welches proportional zum entstehenden Amplifikat ansteigt. Dabei muss in zwei Gruppen unterschieden werden, sequenzunspezifische Signale und sequenzspezifische Signale. Zur ersten Gruppe zählen unspezifische Fluoreszenz-Farbstoffe, die ihre Emissionseigenschaften durch die Interkalation in den DNA-Doppelstrang ändern. Wichtigster Vertreter ist SYBRGreen, welches praktisch auf allen „realtime“-Plattformen angewendet werden kann (Abbildung 3.1). Vorteil dieser Technik sind die niedrigen Kosten sowie die hohe Empfindlichkeit. Ein Nachteil ist, dass jedes doppelsträngige PCR-Produkt Signale generiert. Dies führt dazu, dass auch ein unspezifisches Amplifikat detektiert wird.

Die sequenzspezifische Detektion erfolgt mit Sonden, die innerhalb des Amplifikates binden. Dazu gehören LightCycler-Hybridisierungssonden (Lay und Wittwer, 1997). Dieses Detektionssystem besteht aus zwei Sonden, die benachbart an das Templat binden müssen, um einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zu erzeugen (Abbildung 3.1). Die Signalerzeugung durch FRET beruht darauf, dass der Farbstoff der Donor-Sonde Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, welches den benachbarten zweiten Farbstoff anregt. Dieser emittiert dann Licht einer höheren Wellenlänge als die Donor-Sonde.

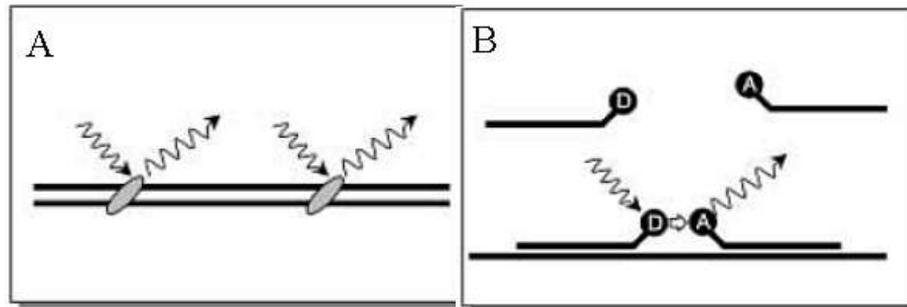


Abbildung 3.1: Prinzipien der verwendeten Detektionssysteme

A: SYBRGreen; B: FRET-Hybridisierungssonden, D: Donorsonde, A: Akzeptorsonde

### 3.1.2 Schmelzkurvenanalyse

Am Ende der PCR erfolgt eine langsame Temperaturerhöhung, während der permanent die Fluoreszenz gemessen wird. Durch die Dissoziation der DNA-Stränge (SYBRGreen) bzw. der Hybridisierungssonden vom DNA-Strang nimmt die Fluoreszenz ab. Die Dissoziation der DNA-Stränge hängt hauptsächlich von deren Länge ab. Mit der Schmelzkurvenanalyse können Primerdimere detektiert werden. Bei der Verwendung von Hybridisierungssonden führt eine Basenfehlpaarung zwischen PCR-Produkt und Sonde zur Destabilisierung der Bindung und somit zu einem Fluoreszenzabfall bei niedrigerer Temperatur. Die erste negative Ableitung der Fluoreszenzänderung über die Temperatur ( $-dF/dT$ ) zeigt den Schmelzpunkt der DNA als Maximum. Eine Verringerung des Schmelzpunktes gegenüber dem zur Sonde komplementären Strang zeigt das Vorhandensein einer Punktmutation an.

### 3.1.3 Detektion und Auswertung der „realtime“-PCR Experimente

Die Experimente wurden im LightCycler<sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der LightCycler Software 4.05. Die Detektion von SYBRGreen-Experimenten erfolgte im Kanal für 530 nm. Die Reaktionen mit Hybridisierungssonden wurden im Kanal für 610 nm detektiert und gegen den Kanal für 530 nm normalisiert. Die CT-Werte wurden im automatischen Modus nach der Methode der 2. Ableitung („second derivate method“) ermittelt.

### 3.1.4 Entwurf von Oligonukleotiden

Bei dem Entwurf der Primer und Sonden wurde die theoretische Schmelztemperatur als wichtiger Parameter zugrunde gelegt. Sie wurde nach der „Nearest-Neighbour“-Methode berechnet (Breslauer

et al. 1986, Sugimoto et al. 1996). Dazu wurde die Analyse-Software OligoCalc benutzt, die frei im Internet zugänglich ist (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Die Salzkonzentration der einwertigen Kationen wurde dabei mit 100 mM angegeben, da der PCR-Puffer 100 mM Kalium enthält. Als Konzentration der Primer wurde 500 nM verwendet.

Die optimale Annealingtemperatur für die Primerpaare wurde mittels SYBRGreen „realtime“ PCR mit 2 ng Standard-DNA ermittelt. Bei den optimalen Annealingtemperaturen sollten weder Primerdimere noch Nebenprodukte auftreten, was mittels Gelelektrophorese überprüft wurde.

Die Donorsonden wurden am 3'-Ende mit Fluoreszein oder Fam6 markiert, die Akzeptorsonden trugen am 5'-Ende den Farbstoff Rox bzw. Cy5. Zudem waren letztere am 3'-Ende phosphoryliert, um eine Verlängerung durch die Polymerase zu verhindern

## 3.2 Erstellen der Plasmidmodellsysteme

In dieser Arbeit wurden zur Etablierung der Methoden künstliche DNA-Templats in Form von Plasmiden verwendet. Es wurden in einem ersten Schritt Plasmide für alle drei zu untersuchenden Genfragmente und darin auftretende Mutationen hergestellt, überprüft und quantifiziert. Anschließend wurden Plasmidlösungen mit definierten Plasmidmengen und Mischungen von Wildtyp und Mutanten hergestellt.

### 3.2.1 Primer

Die verwendeten Primer stammen, soweit möglich, aus der Patentschrift (Steinberg und Scholtka (2004), auf dem das dieser Arbeit zugrunde liegende Projekt basiert. War die Verwendung der patentierten Primer aufgrund von Position oder Schmelztemperatur nicht möglich, wurden neue Primer entworfen. Als Basis dienten die in der Gendatenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) veröffentlichten genomischen Nukleotidsequenzen. In Tabelle 3.1 sind die Zugangsnummern aufgeführt.

Gen	Zugangsnummer
<i>BRAF</i>	NG_007873.1
<i>CTNNB1</i>	NM_001904.3
<i>K-ras</i>	L00045.1

Tabelle 3.1: Gendatenbankzugangsnummern der Nukleotidsequenzen

Die Sequenzen der Oligonukleotide und die berechneten Schmelztemperaturen befinden sich in Tabelle 3.2 .

Primer	Sequenz 5' - 3'	Schmelztemperatur [°C]
BRAF s2	ataggtgattttggtctagc	56
BRAF s2 rox	ataggtgattttggtctagc (Base 18 Rox-markiert)	56
BRAF rev*	gacctcaatgactttctagtaact	60
BRAF fw*	tcctttacttactacacctcagata	60
b-cat s neu	ctgatttgatggagttggacatggc	65
b-cat as neu	gctactgttcttgagtgaaggactga	67
b-cat as*	tcttgagtgaaggactgagaa	60
K-ras s*	ctggtggagatattgatagtg	57
K-ras as*	tctattgttgatcatattcg	55
K-ras F Ch <sup>†</sup>	aggcctgctgaaaatgactg	62
K-ras R Ch <sup>†</sup>	ggcctgcaccagtaaatgca	63

Tabelle 3.2: Primer mit entsprechender Sequenz und berechneter Schmelztemperatur; \*: aus Patentschrift (Scholtka und Steinberg, 2004); †: aus Chen et al. (2004)

### 3.2.2 Verwendete Genfragmente

Die verwendeten Genfragmente stammen aus den Genen *K-ras* (Exon 1), *BRAF* (Exon 15) und *CTNNB1* (Exon 3). Sie wurden im Rahmen der Vorstudie zu dieser Arbeit in das Markerset aufgenommen, da in diesen Sequenzabschnitten gehäuft Punktmutationen auftreten. Genfragmente und Mutationen sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Sie wurden aus genomischer DNA amplifiziert oder mittels PCR-Mutagenese hergestellt.

Gen	Länge in Basenpaaren	Punktmutation	Herkunft	Primerpaar
<i>BRAF</i>	222	Wildtyp	Zelllinie U-266	BRAF fw / BRAF rev
	222	Codon 600 GTG --> GAG	PCR-Mutagenese	BRAF fw / BRAF rev
<i>CTNNB1</i>	226	Wildtyp	Zelllinie U-266	b-cat_s neu / b-cat_as neu
	226	Codon 41 ACC --> GCC	PCR-Mutagenese	b-cat_s neu / b-cat_as neu
	226	Codon 41 ACC --> ATC	PCR-Mutagenese	b-cat_s neu / b-cat_as neu
	226	Codon 45 TCT --> CCT	PCR-Mutagenese	b-cat_s neu / b-cat_as neu
<i>K-ras</i>	243	Wildtyp	Zelllinie U-266	K-ras s / K-ras R Ch
	243	Codon 12 GGT --> TGT	Patientenbiopsieprobe	K-ras s / K-ras R Ch
	243	Codon 12 GGT --> GAT	Zelllinie LS-174-T	K-ras s / K-ras R Ch
	243	Codon 12 GGT --> GCT	Patientenbiopsieprobe	K-ras s / K-ras R Ch
	243	Codon 13 GGC --> GAC	Zelllinie HCT-116	K-ras s / K-ras R Ch

Tabelle 3.3: Zur Plasmidherstellung verwendete Genfragmente, darin vorkommende Punktmutationen, deren Herkunft und die zur Amplifikation verwendeten Primerpaare; fett: mutierte Base

Als Punktmutationen wurden möglichst unterschiedliche Basenaustausche in sich unterscheidenden Umgebungssequenzen gewählt, um die zu entwickelnde Methode auf ihre Universalität zu prüfen.

### 3.2.3 DNA-Extraktion und Aufreinigung

DNA aus Patientenbiopsieproben bzw. aus Zelllinien wurde mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) extrahiert und aufgereinigt. Die Konzentration der gelösten DNA wurde mittels UV bei 260 nm bestimmt.

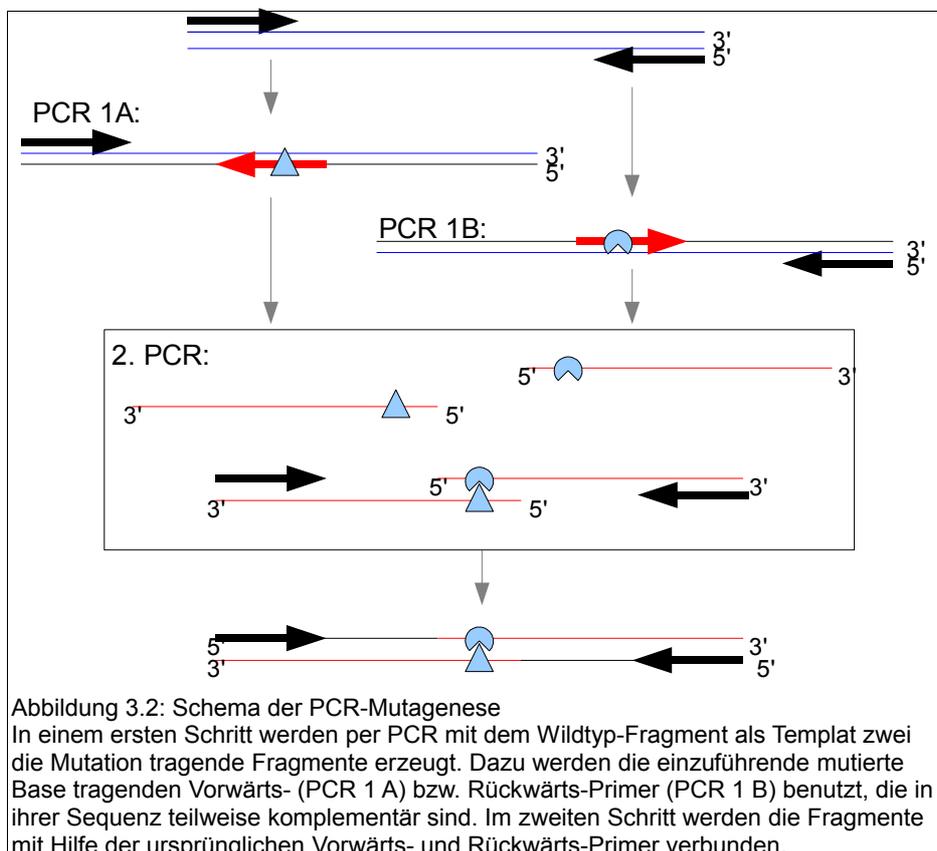
### 3.2.4 Amplifikate für die Plasmidherstellung

Mit der gereinigten genomischen DNA als Templat wurden PCRs durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.3 und die entsprechenden Primersequenzen in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Als DNA-Polymerase wurde FastStartTaq (Roche Diagnostics) verwendet. Sie besitzt die Eigenschaft, ein Adenin an das Ende des PCR-Produkts anzufügen. Diese Adenin-Überhänge werden bei einer späteren Klonierung benutzt, um mit den Thymin-Überhängen des Vektors zu ligieren. Die PCR-Produkte wurden im Gel aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und die Konzentration bestimmt.

### 3.2.5 PCR-Mutagenese

Standen die gewünschten Punktmutationen nicht in Form von genomischer DNA zur Verfügung, wurden sie mittels PCR-Mutagenese erzeugt. Dabei wird die Punktmutation mittels Primern eingefügt, die die zu verändernden Basen enthalten. Eine schematische Darstellung der PCR-Mutagenese ist in Abbildung 3.2 zu sehen. Es werden zwei Fragmente hergestellt, wobei das vordere die veränderte Base im Rückwärtsprimer und das hintere entsprechend im Vorwärtsprimer enthält.



Die beiden Einzelfragmente werden im Gel aufgetrennt, ausgeschnitten und mit QIAquickGel Extraction Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Anschließend werden die beiden Fragmente in einer weiteren PCR mit den außen liegenden Vorwärts- und Rückwärtsprimern amplifiziert und die überlappenden Fragmente dadurch verbunden. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Gen	Mutation	Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
<i>CTNNB1</i>		b-cat as neu	gctactgttcttgagtgaggactga
		b-cat s neu	ctgatttgatggagttggacatggc
	Codon 41 ACC --> ATC	b-cat-F cd41-atc	gtgccactatcacagctcc
		b-cat-R cd41-atc	cactcagagaaggagctgtgatag
	Codon 41 ACC --> GCC	b-cat-F cd41-gcc	gtgccactg <b>g</b> ccacagctcc
		b-cat-R cd41-gcc	cactcagagaaggagctgt <b>g</b> gcag
	Codon 45 TCT --> CCT	b-cat-F cd45 cct	ccacagctcctcctctgagtg <b>g</b>
b-cat-R cd45-cct		ccactcagag <b>g</b> aggagctgt <b>g</b>	
<i>BRAF</i>		BRAF fw	tcctttactactacacctcagata
		BRAF rev	gacctcaatgacttttagtaact
	Codon 600 GTG --> GAG	BRAF Mut599 s	cgagattctctgtagctagacc
		BRAF Mut599 as	tggtctagctacagagaaatctc

Tabelle 3.4: Primer für PCR-Mutagenese; fett: auszutauschende Base

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend mittels Sequenzierung auf das Vorhandensein der Punktmutationen überprüft.

### 3.2.6 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 1%ige und 1,5%ige Agarosegele mit 1x TBE-Puffer und 0,07 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. Vom PCR-Produkt wurden 5 µl unter Zusatz von 2 µl Ladepuffer aufgetragen und mit einer Spannung von 120 V aufgetrennt (Sambrook et al. 2001). Zur Identifizierung der Fragmentgrößen wurde eine 100 bp-Leiter (NEB) eingesetzt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert.

### 3.2.7 Gelextraktion von PCR-Produkten und Plasmiden

Die Isolierung einzelner DNA-Banden aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquickGel Extraction Kit der Firma QIAGEN (Hilden). Hierzu wurden unter UV-Licht die gewünschten Banden mit einem Skalpel ausgeschnitten, gewogen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben. Die gereinigte DNA wurde mit 30 bis 50 µl Elutionspuffer (QIAGEN) eluiert.

### 3.2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Teilweise wurden PCR-Produkte direkt ohne vorherige Gelelektrophorese aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben. Das gereinigte PCR-Produkt wurde in 30 bis 50 µl Elutionspuffer aufgenommen.

### 3.2.9 Klonierung

Die Genfragmente (Tabelle 3.3) wurden in den pGEM-T-Vector (pGEM®-T Vector System, Promega) ligiert. Dafür wurden pro Ligationsansatz 5 µl 2 x-Puffer, 2,5 µl Insert, 0,8 µl Ligase und 0,5 µl Vektor verwendet und auf 10 µl mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die Plasmide wurden in *E.coli* XL-1 blue (Stratagene) transformiert. Dazu wurden 100 µl kompetente Zellen langsam 15 min. auf Eis aufgetaut und der gesamte Ligationsansatz hinzugefügt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation und ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C. Anschließend wurde nochmals 30 min. auf Eis inkubiert, 450 µl SOC-Lösung hinzugefügt und 1 Stunde bei 37°C leicht geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde dann auf 2 LB/IPTG/X-Gal/Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

### 3.2.10 Plasmidpräparation

Positive, weiße Klone wurden in 2ml LB-Medium + 2µl Ampicillin (100mg/ml) über Nacht bei 37°C angezogen. Die Plasmide wurden aus den Flüssigbakterienkulturen mittels QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben präpariert.

### 3.2.11 Überprüfung der Klonierung

Die Plasmide wurden mittels „realtime“ PCR auf das Vorhandensein des Inserts überprüft. Dazu wurde der zum Klonpicken verwendete Zahnstocher kurz in den PCR-Ansatz getaucht. Die Insertkontroll-PCRs wurden mit auf dem Insert liegenden Primern durchgeführt und ergaben somit nur dann ein Produkt, wenn das Insert vorhanden war. Außerdem wurden die Insert-Kontroll-PCR-Produkte in der Gelelektrophorese auf ihre Größe überprüft.

### 3.2.12 Linearisierung

Zirkulär vorliegende Plasmide neigen zur Bildung von Sekundärstrukturen und können dadurch die Bindung von Oligonukleotiden verhindern. Die zu entwickelnden Detektionssysteme sollen an linearen DNA-Fragmenten zum Einsatz kommen. Um möglichst ähnliche Voraussetzungen für die Plasmide zu schaffen, wurden sie mittels Restriktionsenzymverdau linearisiert.

Dazu wurden 35 µl Plasmid (ca. 20 – 40 ng/µl), 1 µl Enzym SACL (20 U/µl, NEB), 0,5 µl BSA und 5 µl 10 x NEB1-Puffer in einem Gesamtvolumen von 60 µl bei 37°C über Nacht inkubiert. Der Restriktionsverdauansatz wurde im Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde ungeschnittenes Plasmid verwendet. Die geschnittenen Plasmide wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels QIAquickGel Extraction Kit (QIAGEN) aufgereinigt.

### 3.2.13 Sequenzierung

Alle als DNA-Template verwendeten beziehungsweise zu klonierenden PCR-Produkte und alle erhaltenen Plasmide wurden mittels Sequenzierung auf ihre Sequenz überprüft. Dazu wurden die DNAs aufgereinigt und in einer Konzentration von 30 ng/µl bzw. 50 ng/µl an die Firma GATC

(Konstanz) versandt. Als Sequenzierprimer wurde einer der PCR-Primer oder der auf dem Plasmid befindliche Standardprimer M13-FP verwendet. Die Auswertung der Sequenzierergebnisse erfolgte anhand der ABI-Dateien mit der frei erhältlichen Software BioEdit v7.0.9 (Ibis Biosciences, Carlsbad). Bei nicht eindeutigen Sequenzierkurven wurde die Sequenzierung auf dem Gegenstrang wiederholt.

### 3.2.14 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels PicoGreen-Messung (Quant-iT™ PicoGreen®, Invitrogen). PicoGreen interkaliert in doppelsträngiger DNA und eignet sich für die Bestimmung von geringen DNA-Konzentrationen. Die Verdünnungen der DNA und der mitgelieferten Standard-DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Die Messung erfolgte im LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Fluoreszenz wurde bei 530 nm gemessen. Die DNA-Konzentrationen wurden mittels LightCycler-Software Version 4.05 anhand der Standardgeraden (10 bis 0,01 ng/µl) berechnet.

Die Konzentrationsbestimmung genomischer DNA erfolgte mittels UV-Absorption bei 260 nm. Mit Hilfe des Spektrophotometers (Ultrospec 4000, Amersham Pharmacia Biotech) wurden jeweils 1:10 Verdünnungen des Analyten vermessen.

Zur Berechnung der DNA-Konzentrationen wurde eine optische Dichte von 1 OD<sub>260</sub> = 50 ng/µl verwendet. Die Berechnung erfolgte nach der Formel  $c = E \cdot 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \cdot \text{Verdünnung}$ , mit E = Absorption bei 260 nm.

### 3.2.15 Berechnung der Kopienzahl

Die zuvor bestimmten Massenkonzentrationen wurden mit Hilfe eines „online“ verfügbaren Rechners (<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>) in Kopienzahl Plasmid pro Volumen umgerechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass ein Basenpaar eine Masse von 1 Dalton besitzt, was 650 g/Mol entspricht. Die Größe des Plasmids setzt sich aus der des Vektors (3000 bp) und der des Inserts zusammen. Mit der Avogadrozahl ( $6.022 \times 10^{23}$  Moleküle/Mol) lässt sich die Anzahl der Kopien pro Masse berechnen.

### 3.2.16 Verdünnungen und Mischungen

Alle Plasmidlösungen wurden auf eine Konzentration von 50 Millionen Kopien/µl (entspricht etwa 175 pg/µl bzw. 83 pM) eingestellt. Anschließend wurden serielle 1:10 Verdünnungen bis zu einer Konzentration von 500 Kopien/µl (1,7 fg/µl) für die mutierten Fragmente und bis zu 5 Millionen Kopien/µl für die Wildtypplasmide hergestellt. Als Verdünnungsmedium wurden Träger-Nukleinsäuren (HSTE, Heringssperma-DNA) verwendet. Die Verdünnungen wurden mittels der in der „realtime“-PCR erhaltenen CT-Werte überprüft.

Aus den Verdünnungen wurden Mischungen von Wildtyp und Mutante hergestellt, wobei in jeder

Mischung 5 Millionen Kopien/µl Wildtyp verwendet wurden. Der Anteil der mutierten Fragmente reichte in 1:10 Schritten von 10 bis 0,01%, was einem Mischungsverhältnis von 1: 10 bis 1:10 000 entspricht.

### 3.2.17 Überprüfung der Verdünnungen mittels CT-Wert

Auf Basis der Quantifizierungen wurden Verdünnungen der Plasmide bzw. PCR-Produkte hergestellt. Um sicherzustellen, dass Wildtyp-DNA und mutierter DNA in zueinander definierten Mengen vorliegt, wurden die hergestellten Verdünnungen in einem PCR-Lauf mit SYBRGreen auf ihre CT-Werte überprüft. In der Tabelle 3.5 sind die verwendeten PCR-Protokolle aufgeführt.

<i>BRAF</i>			<i>CTNNB1</i>			<i>K-ras</i>		
Primer	Konzentration	MgCl <sub>2</sub>	Primer	Konzentration	MgCl <sub>2</sub>	Primer	Konzentration	MgCl <sub>2</sub>
BRAF fw	0,4 µM	3 mM	b-cat s neu	0,2 µM	4 mM	K-ras s	1 µM	5 mM
BRAF rev	0,4 µM		b-cat as neu	0,8 µM		K-ras R Ch	0,1 µM	
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,5 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA, 1 x SYBRGreen und MgCl <sub>2</sub> und Primer in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.								
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 45 Zyklen mit 10 s 95 °C / 30 s 60 °C / 15 s 72 °C (Heizrate 20 °C/s).								

Tabelle 3.5: PCR-Protokolle zur Überprüfung der Konzentrationen der Plasmidsysteme *BRAF*, *CTNNB1* und *K-ras* mittels CT-Werte

Bei Abweichungen der CT-Werte zwischen Wildtyp- und mutiertem Fragment wurden die Konzentrationen neu eingestellt.

## 3.3 Evaluierung verschiedener Methoden zum Nachweis von Punktmutationen

### 3.3.1 Oligonukleotidligation

Zwei Oligonukleotide sollen auf dem DNA-Komplementär-Strang hybridisieren. Das vordere Oligonukleotid endet mit seinem 3'-Ende an der Mutationsstelle und trägt hier die mutierte Base. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Schmelztemperatur des <i>BRAF</i> -Sequenzbereichs	Länge in bp
BRAF Li-abF1-1	catg <b>cgctatgatctggttacg</b> actgatgggaccactccatcgagattc	63°C	51
BRAF Li-abR1-2p	Phos- <b>tctgtagctagaccaaatacctatgaataccgtagagaaaagccgc</b>	56°C	49

Tabelle 3.6: Oligonukleotidligation: Sequenzen der Oligonukleotide. blau: künstliche Primersequenz, rot: mutierte Base

Durch eine Ligase werden die beiden Oligonukleotide bei Bindung an die mutierte Sequenz verknüpft, währenddessen im Falle des Wildtypstrangs aufgrund der Basenfehlpaarung keine Ligation stattfindet (Abbildung 3.3).

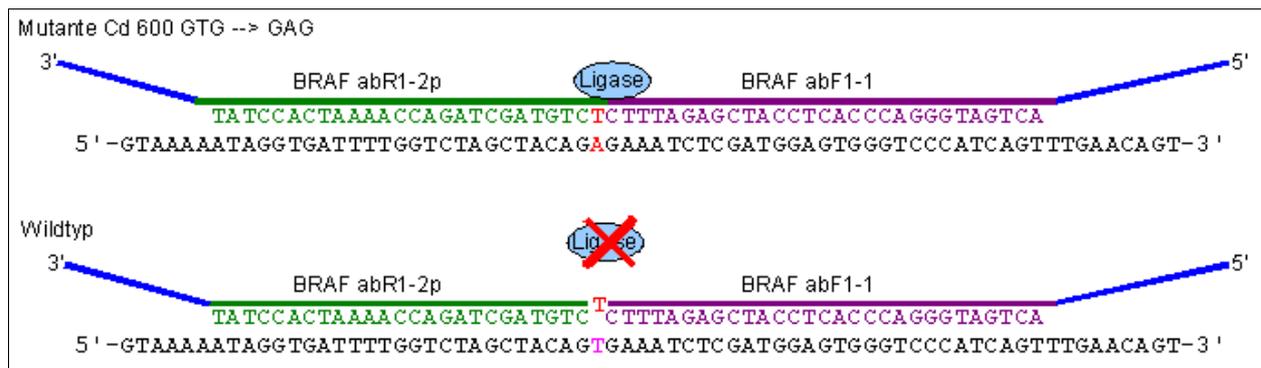


Abbildung 3.3: Oligonukleotidligation

Dargestellt sind die Antisense-Stränge von Mutante Cd 600 GTG --> GAG und Wildtyp und die beiden zu ligierenden Oligonukleotide (grün und violett). blau: künstlich eingefügte Primersequenz; rot: mutierte Base; pink: Wildtypbase an Position der Mutation

Die Detektion des ligierten Fragments soll über die Amplifikation von Primersequenzen erfolgen, die sich am 5'-Ende bzw. am 3'-Ende der beiden zur Ligation eingesetzten Oligonukleotide befinden. Eine PCR mit diesen Primersequenzen ergibt nur ein PCR-Produkt, wenn eine Ligation stattgefunden hat. Die Ligation wurde im Thermocycler durchgeführt. Der Ligationsansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Ligationsansatz		Reaktion
Plasmid (Wildtyp bzw. Mutante Cd 600 GTG -->GAG)	100 Millionen Kopien	20 Zyklen á:
BRAF Li-abF1-1	0,2 µM	30 s 94°C
BRAF Li-abR1-2p	0,2 µM	4 min 53°C
Taq DNA Ligase	20 U	
TAQ DNA Ligase Reaction Puffer	1 x	Reaktionsstop:
ad	20 µl	0,5 µl 0,5 mM EDTA

Tabelle 3.7: Ligationsansatz und Reaktionsbedingungen für Oligonukleotidligation

Anschließend wurden zur Detektion des Ligationsproduktes 5 µl des Ligationsansatzes in einem 2%igen Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden die nichtligierten Oligonukleotide verwendet.

Zur Überprüfung der Ligation mittels PCR wurde die Bande, die der Länge des ligierten Produktes (100 bp) entspricht, aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und als Templat in eine „realtime“-PCR mit Hybridisierungssonden eingesetzt. Das PCR-Protokoll befindet sich in Tabelle 3.8.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
abF1	catgcgctatgatctggttacg	61°C		0,4 µM	Primer
abR1	gcggcttttctatcacggtattc	61°C		0,4 µM	Primer
BRAF LNA fluo	aGCtaCa <b>GTG</b> aaa-Fluoreszein	64°C		0,075 µM	Sonde
BRAF L-Rox	Rox-ctcgatggagtggtcccatcagtttga-Phos	62°C		0,15 µM	Sonde
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,25 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA ,4 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer sowie Sonden in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 45 Zyklen mit 10 s 95 °C / 10 s 59 °C / 10 s 72 °C (Heizrate 20 °C/s).					
Im Anschluss an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 0 s 95 °C / 10 s 40 °C, 0 s 80 °C ( 0,1 °C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 610 nm.					

Tabelle 3.8: Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse für *BRAF* Oligonukleotidligation zu Überprüfung der Ligations; fett: Codon 600; Großbuchstaben: LNA; PCR-Produktlänge: 100 bp

### 3.3.2 Allelspezifische PCR

Die allelspezifische PCR wurde ebenfalls am Plasmidsystem *BRAF* getestet. Bei dieser Methode endet der Vorwärtsprimer mit seinem 3'-Ende an der Stelle der Punktmutation. Es wurde nur der Primer mit der mutierten Base am 3'-Ende eingesetzt, so dass nur die Mutante amplifiziert werden kann. Auf dem Wildtyp-Fragment findet aufgrund der Basenfehlpaarung keine Amplifikation statt.

Die Versuche wurden als „realtime“-PCR mit SYBRGreen am reinen System durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über die CT-Werte.

Der sequenzspezifische Primer wurde als hochaufgereinigte Highpure-Variante verwendet, welche zu 99% aus dem vollständig synthetisierten Nukleotid besteht. Als Polymerase kam Diamond DNA Polymerase (Bioline, Luckenwalde) zum Einsatz, welche keine 3' – 5' Proofreading-Funktion besitzt und somit die 3'- Base des sequenzspezifischen Primers aufgrund der Basenfehlpaarung an dem Wildtyp-Fragment nicht entfernen kann. Um die Amplifikation des Wildtyp-Fragments effektiver zu inhibieren, wurden zusätzlich Experimente mit einer LNA-Sonde durchgeführt, die die Bindung des Primers an dem Wildtyp-Fragment verhindert. Alle PCRs wurden als „realtime“-PCR mit SYBRGreen durchgeführt. Das PCR-Protokoll ist in Tabelle 3.9 dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
BRAF s5	gtattttggtctagctacaga	57°C	sense	0,2 µM	Primer
BRAF rev	gacctcaatgactttctagtaact	60°C	antisense	0,2 µM	Primer
BRAF LNA	aGCtaCa <b>GTG</b> aaa-Phos	64°C	antisense	2 µM	LNA-Sonde
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,25 U Diamond DNA Polymerase, 1 x NH <sub>4</sub> -Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 0,75 µg/µl BSA , 4 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 x SYBRGreen und Primer sowie Sonde in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 1 min Denaturierung folgten 45 Zyklen mit 5 s 95 °C / 10 s 61 °C / 10 s 72 °C (Heizrate 20 °C/s).					

Tabelle 3.9: PCR-Protokoll für die allelspezifische PCR an *BRAF*, Fragmentlänge 162 bp

Zur Optimierung wurden das Temperaturprofil und die Magnesiumchloridkonzentration variiert. Als Kontrollreaktionen wurden PCRs mit dem Vorwärtsprimer BRAF s2 durchgeführt, dessen 3'-Ende 3 Basen aufwärts von der Mutation liegt.

### 3.4 Etablierung des Nachweissystems zur Punktmutationsdetektion: Schmelzkurvenanalyse

Für die Etablierung der LNA-clamp-PCR als Anreicherungsverfahren von Punktmutationen war ein System erforderlich, mit dem die Funktionalität auch in Mischungen von Mutante und Wildtyp getestet werden kann, wobei CT-Werte nicht geeignet sind. Dafür wurde die Schmelzkurvenanalyse von Hybridisierungs sonden etabliert.

#### 3.4.1 Relatives Detektionslimit der Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse sollte zur Ermittlung des relativen Detektionslimits der LNA-clamp-PCR eingesetzt werden. In einem ersten Versuch musste gezeigt werden, dass die Schmelzkurvenanalyse zum Nachweis von Wildtyp und Mutante in einer Mischung geeignet ist. Darüber hinaus musste die Sensitivität der Methode bestimmt werden, da das später mit dieser Methode ermittelte Detektionslimit der LNA-clamp-PCR um das Detektionslimit der Schmelzkurvenanalyse verstärkt wird. Um auf die Leistungsfähigkeit der LNA-clamp-PCR schließen zu können, muss dieser Wert bekannt sein.

Das relative Detektionslimit wurde beispielhaft für das Fragment *K-ras* ermittelt. Dazu wurden Mischungen von Wildtyp und in Codon 12 von GGT zu GAT mutierter Sequenz des Fragments *K-ras* in den Verhältnissen 1:1, 1:5 und 1:10 amplifiziert und über Schmelzkurven analysiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
K-ras_s	ctggaggagtattgatagtg	57°C	sense	0,5 µM	Primer
K-ras_as	tctattgttgatcatattcg	55°C	antisense	0,5 µM	Primer
K-ras fluo1	gttggagctggggcgtag	62°C	sense	0,15 µM	Sonde
K-ras Cy5 1	Cy5-caagagtgacctgacgatacagcta-Phos	67°C	sense	0,3 µM	Sonde
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,25 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA, 3 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer sowie Sonden in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 40 Zyklen mit 10 s 95 °C / 30s 60 °C / 10 s 72 °C (Heizrate 20 °C/s).					
Im Anschluss an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 0 s 95 °C / 10 s 40 °C, 0 s 80 °C ( 0,1 °C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 670 nm.					

Tabelle 3.10: *K-ras* PCR zur Überprüfung des Detektionslimits der Schmelzkurvenanalyse; fett: Codons 12 und 13; PCR-Produktlänge: 202 bp

#### 3.4.2 Protokolle und Oligonukleotidsequenzen zur Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse wurde entweder an den in der LNA-clamp-PCR gewonnenen PCR-Produkten direkt ohne nochmalige Amplifikation durchgeführt, oder die PCR-Produkte wurden erneut als DNA-Templat in eine PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse eingesetzt.

Für ersteres Verfahren wurden die PCR-Produkte aufgereinigt (Qiaquick PCR Purification Kit, QIAGEN) und 10 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 10 µl Schmelzkurvenmix (Tabelle 3.11) gemischt. Diese Variante kam bei *BRAF* mit LNA als Primerblocker zum Einsatz.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
BRAF fluo	ctccatcgagatttctct-Fluoreszein	55°C	antisense	0,08 µM	Sonde
<b>Schmelzkurvendetektmix:</b> 20 µl enthielten 1 x FastStart-Puffer, 0,75 µg/µl BSA, 4 mM MgCl <sub>2</sub> und Sonde in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>Temperatur-Programm:</b> Es erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 30s 95 °C / 45s 40 °C / 0s 75 °C ( Heizrate 0,1 °C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 610 nm.					

Tabelle 3.11: Schmelzkurvenanalyse für *BRAF* LNA-clamp-PCR mit Primerblocker; fett: mutierte Base; Fluoreszeinsonde entspricht mutierter Sequenz

Die Reamplifikation erfolgte nach Verdünnung der PCR-Produkte aus der LNA-clamp-PCR 1:50 bis 1:75 in dest. Wasser. Alle PCRs wurden als „seminested“-PCRs durchgeführt. Es wurden 2 µl als Templat eingesetzt. Die PCR-Protokolle sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt (*BRAF* Tabelle 3.12, *CTNNB1* Tabelle 3.13, *K-ras* Tabelle 3.14). Die einzusetzenden Konzentrationen der Primer wurden auf Vermeidung des Hook-Effektes optimiert. Der Hook-Effekt führt dazu, dass am Endpunkt der PCR die Rehybridisierung der Einzelstränge mit der Hybridisierung der Sonden konkurriert. War dies der Fall, wurden die Primer asymmetrisch eingesetzt, so dass der Strang, auf dem die Sonden binden, stärker amplifiziert wird.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
BRAF s2	ataggtgatttggcttagc	56°C	sense	0,8 µM	Primer
BRAF rev	gacctcaatgacttctagtaact	60°C	antisense	0,2 µM	Primer
BRAF fluo1	cagacaactgttcaaactgatgggaccactcca-6Fam	71°C	antisense	0,075 µM	Sonde
BRAF Rox1	Rox-cgagattt <b>cact</b> gtagctagacc-Phos	63°C	antisense	0,15 µM	Sonde
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,25 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA, 3 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer sowie Sonden in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 30 Zyklen mit 10 s 95 °C / 15 s 60 °C / 20 s 72 °C (Heizrate 20 °C/s).					
Im Anschluss an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 0 s 95 °C / 10 s 40 °C, 0 s 80 °C ( 0,1 °C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 610 nm.					

Tabelle 3.12: Reamplifikation und Schmelzkurvenanalyse für *BRAF* LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker; fett: Codon 600; PCR-Produktlänge: 168 bp

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
b-cat_s neu	ctgatttgatggagttggacatggc	65°C	sense	0,2 µM	Primer
b-cat_as	tcttgagtgaaggactgagaa	60°C	antisense	0,8µM	Primer
b-cat fluo1	cagcaacagctcttacctggactctggaatccattctggg -6Fam	74°C	sense	0,15 µM	Sonde
b-cat Rox1	Rox-cact <b>accacagctccttctct</b> -Phos	62°C	sense	0,3 µM	Sonde
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,25 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA , 4 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer sowie Sonden in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 30 Zyklen mit 10 s 95 °C / 15 s 60 °C / 15 s 72 °C (Heizrate 20 °C/s).					
Im Anschluss an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 0 s 95 °C / 10 s 40 °C, 0 s 80 °C ( 0,1 °C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 610 nm.					

Tabelle 3.13: Reamplifikation und Schmelzkurvenanalyse für *CTNNB1* LNA-clamp-PCR; fett: Codons 41 und 45; PCR-Produktlänge: 217 bp

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
K-ras F Ch	aggcctgctgaaaatgactg	62°C	sense	0,5 µM	Primer
K-ras R Ch	ggctcctgcaccagtaaatgca	63°C	antisense	0,5µM	Primer
K-ras Rox Ch	Rox-cctac <b>gccatcagctcca</b> -Phos	61°C	antisense	0,15 µM	Sonde
K-ras fluo CH	cgccacaaaaatgattctgaattagctgtatcgtcaagg cact-Fluorescein	75°C	antisense	0,3 µM	Sonde
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,25 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA , 5 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer sowie Sonden in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 35 Zyklen mit 2 s 95 °C / 15 s 60 °C / 15 s 72 °C (Heizrate 20 °C/s).					
Im Anschluss an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 0 s 95 °C / 10 s 40 °C, 0 s 80 °C ( 0,1 °C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 610 nm.					

Tabelle 3.14: Reamplifikation und Schmelzkurvenanalyse für *K-ras* LNA-clamp-PCR; fett: Codons 12 und 13; PCR-Produktlänge: 164 bp; Rox-Sonde entspricht mutierter Sequenz

### 3.4.3 Sequenzierung

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse wurden die PCR-Produkte aus der LNA-clamp-PCR von der Firma GATC (Konstanz) sequenziert. Dazu wurden PCR-Produkte aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN). Als Sequenzierprimer wurde einer der beiden LNA-clamp-PCR-Primer verwendet.

Die Sequenzierkurven wurden auf die Übereinstimmung mit den Schmelzkurveergebnissen geprüft. Eine Schmelzkurve mit Temperaturmaxima von Wildtyp und Mutante muss auch in der Sequenzierkurve beide Basen an der Position der Punktmutation zeigen.

## 3.5 Etablierung der Methode zur Anreicherung von Punktmutationen: LNA-clamp-PCR

### 3.5.1 LNA

Bei dem Nukleotidanalogen „locked nucleic acid“ (LNA, Abbildung 3.4) handelt es sich um ein modifiziertes RNA-Nukleotid, bei dem das C2- und C4-Atom der Ribose durch eine Sauerstoff-Methylenbrücke verbunden ist. Dadurch wird die Ribose in der C3'-endo-Konformation (Abbildung 3.5), der charakteristischen Konformation in der A-Doppelhelix, fixiert (Silahtaroglu et al., 2004). LNA ist dadurch strukturell weniger flexibel und hybridisiert zu Doppelhelices mit gegenüber DNA-Oligomeren erhöhter Affinität. Dies resultiert bei komplementären Sequenzen in einer erhöhten Schmelztemperatur. Unterscheiden sich die Sequenzen jedoch nur in einer Base, verringert sich die Schmelztemperatur um bis zu 26°C (Mouritzen et al., 2003) und destabilisiert somit das LNA-DNA-Hybrid. Die Veränderung der Schmelztemperatur ist von der Länge des LNA-Oligonukleotids, dem LNA-DNA-„Mismatch“, der Position der LNA-Monomere und der Position der Basenfehlpaarung im LNA-Oligonukleotid abhängig (You et al., 2006).

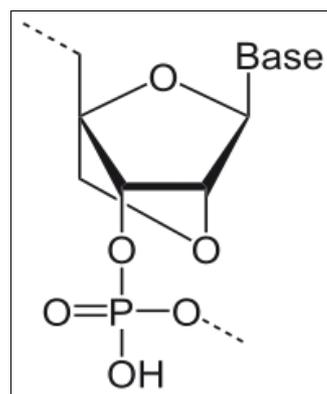


Abbildung 3.4: LNA-Monomer

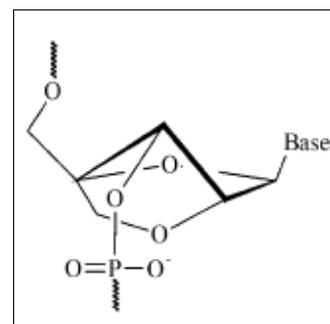


Abbildung 3.5: C3'-endo-Konformation eines LNA-Monomers (Silahtaroglu et al., 2004)

### 3.5.2 Prinzip der LNA-clamp-PCR

Mit der zu entwickelnden Methode sollen Punktmutationen im hohen Überschuss von Wildtyp-DNA detektiert werden. Dazu soll das mutierte Fragment gegenüber dem nichtmutierten angereichert werden. Dies erfolgt in einer PCR, in der die Amplifikation des nichtmutierten Fragments unterdrückt werden soll. Zur Unterdrückung der Amplifikation wird ein so genannter Blocker verwendet. Dabei handelt es sich um ein kurzes Oligonukleotid, bestehend aus LNA- und DNA-Monomeren. Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften der LNA bindet der Blocker an komplementären DNA-Strängen so fest, dass die Amplifikation in der PCR verhindert wird. Der Blocker selbst wird dabei nicht verlängert. Bei einer Basenfehlpaarung aufgrund einer Punktmutation findet dagegen keine Bindung des LNA-Oligonukleotids auf dem Matrizenstrang und somit keine Blockade der Amplifikation statt. Der Vorgang des Blockens durch ein Oligonukleotid wird in der Literatur mit dem Begriff „clamp“ beschrieben. Eingeführt wurde der Begriff von Orum und Kollegen (1993). Er

bedeutet übersetzt arretieren oder einklemmen und steht dafür, dass die PCR für eine Sequenz arretiert wird (hier die Wildtypsequenz), während die Amplifikation der anderen Sequenz (hier die mutierte) stattfindet. Der Begriff wurde in dieser Arbeit in Anlehnung an die Literatur übernommen.

Für die Position des Blockers gibt es zwei Möglichkeiten: Er kann zwischen den Primern liegen und somit eine Amplifikation durch die Polymerase verhindern oder im Bereich der Primerbindungsstelle und dadurch die Bindung eines Primers blockieren.

### 3.5.3 LNA-Blocker-Entwurf

Die Blocker müssen einerseits an die Zielsequenz, dem Wildtyp-Fragment, fest binden, um die Amplifikation durch die Polymerase zu verhindern und andererseits muss die Bindung durch eine Basenfehlpaarung, hervorgerufen durch eine Mutation in der Zielsequenz, größtmöglich destabilisiert werden. Das Bindungsverhalten wird beeinflusst durch die Länge des Blockers, die an der Basenfehlpaarung beteiligten Basen und die Umgebungssequenz der zu detektierenden Mutation. Der Einfluss dieser Parameter auf das Bindungsverhalten ist noch weitgehend unerforscht. Das tatsächliche Verhalten muss empirisch bestimmt werden.

Als Blocker werden Hybridoligomere eingesetzt, die sowohl aus DNA-Basen als auch aus LNA-Basen bestehen. Auch der Anteil und die Positionen der LNA-Basen innerhalb des Blockers spielen eine Rolle bei der Bindung. Um die Kosten für die Blocker gering zu halten, wurde ein möglichst geringer LNA-Anteil verwendet.

Um die Extension der Blocker durch die Polymerase zu verhindern, wird das 3'-Ende phosphoryliert. Die LNA-Sonden wurden bei Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm) synthetisiert.

### 3.5.4 Berechnung der Schmelztemperatur von LNA-Oligonukleotiden

Das Bindungsverhalten der Blocker wird in erster Linie durch ihre Schmelztemperatur charakterisiert. Zur theoretischen Schmelztemperaturbestimmung der LNA-Blocker gegenüber komplementärer DNA wurde der online zugängliche Rechner der Firma Exiqon (<http://lna-tm.com/>) benutzt (Tabelle 3.15). Dabei wurde die Standardeinstellung für die totale Oligonukleotidkonzentration (2  $\mu\text{M}$ ) beibehalten. Die Salzkonzentration wurde mit 100 mM angegeben.

Die Verringerung der Schmelztemperatur durch eine Basenfehlpaarung kann bisher nicht theoretisch bestimmt werden. Es muss empirisch festgestellt werden, bei welchen Reaktionsbedingungen die Destabilisierung der Bindung durch die Basenfehlpaarung ausreicht, um die Synthese von mutierten Fragmenten zuzulassen.

Die Schmelztemperatur der Amplifikationsblocker wurde möglichst weit über die der Elongationstemperatur von 72°C gelegt, um die Verlängerung des Wildtypstranges weitestgehend zu verhindern. Eine zu hohe Schmelztemperatur könnte jedoch dazu führen, dass die Destabilisierung durch eine Basenfehlpaarung nicht ausreicht, um die Amplifikation des mutierten

Fragments zuzulassen.

Der Blocker BRAF LNA1 wurde als Primerblocker entworfen. Er soll die Bindung des Vorwärtsprimers verhindern. Seine Schmelztemperatur ist deshalb von der Primerbindungstemperatur abhängig.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Länge in bp	LNA-Monomere	Schmelztemperatur in °C
BRAF-LNA1	aGCtaCaGTGaaa-Phos	13	6	64
BRAF-LNA2	aGATTTCACTGTAGc-Phos	15	13	86
b-cat-LNA1	gcCACT <b>AC</b> CACAGct	15	11	88
b-cat-LNA2	gcTCCTTCTCTGagt	15	10	86
K-ras-LNA Rox1	Rox-tgcctaCGCCACCAGc-Phos	16	9	88

Tabelle 3.15: Theoretische Schmelztemperaturen der LNA-Blocker; Großbuchstaben: LNA-Monomer; fett: mutierte Base

### 3.5.5 Protokolle der LNA-clamp-PCRs

Zur Etablierung der LNA-clamp-PCR wird die „realtime“-PCR Technologie verwendet. Damit können die Eigenschaften des Verfahrens beurteilt und die Bedingungen entsprechend optimiert werden. Zur Optimierung wurden die Parameter Blockerkonzentration, Primerkonzentration, Polymerasekonzentration, Magnesiumchloridkonzentration, Annealingtemperatur und Elongationstemperatur variiert. Als DNA-Templat wurden zur Optimierung die Wildtyp- bzw. mutierte Sequenz tragenden Plasmide verwendet. Pro Reaktion wurden 2 µl der zuvor hergestellten Verdünnungen eingesetzt. Die Auswertung erfolgte über die CT-Werte.

In den nachfolgenden Tabellen sind die optimalen Bedingungen für die Fragmente *BRAF* (Tabelle 3.16, 3.17), *CTNNB1* (Tabelle 3.18, 3.19) und *K-ras* (Tabelle 3.20) aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
BRAF s2 rox	ataggtgatttggtctagc (Base 18 Rox-markiert)	56°C	sense	0,2 µM	Primer
BRAF rev	gaccttcaatgacttctagtaact	60°C	antisense	0,2 µM	Primer
BRAF LNA1	aGCtaCa <b>GT</b> Gaaa-Phos	64°C	sense	2 µM	Blocker
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,5 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA, 1 x SYBRGreen, 4 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer sowie Blocker in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 35 Zyklen mit 10 s 95 °C / 10 s 68 °C / 8 s 60°C / 10 s 72 °C (Heizrate 20 °C/s).					

Tabelle 3.16: Bedingungen für *BRAF* LNA-clamp-PCR mit LNA-Blocker als Primer-Blocker; fett: Codon 600; Großbuchstaben: LNA; PCR-Produktlänge: 168 bp

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelz-temperatur	Strang	Konzentration	Funktion
BRAF fw	tcctttacttactacacctcagata	60°C	sense	0,1 µM	Primer
BRAF rev	gaccttcaatgacttttagtaact	60°C	antisense	0,8 µM	Primer
BRAF LNA2	aGATTT <b>CACT</b> GTAGc-Phos	86°C	antisense	0,8 µM	Blocker
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,25 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA, 1 x SYBRGreen, 5 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer sowie Blocker in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 45 Zyklen mit 5 s 95 °C / 10 s 74 °C / 10 s 61°C / 10 s 74 °C (Heizrate 20 °C/s).					

Tabelle 3.17: Bedingungen für *BRAF* LNA-clamp-PCR mit LNA als Amplifikationsblocker; fett: Codon 600, Großbuchstaben: LNA; PCR-Produktlänge: 222 bp

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
b-cat_s neu	ctgatttgatggagttggacatggc	65°C	sense	0,2 µM	Primer
b-cat_as neu	gctactgttcttgagtgaaggactga	67°C	antisense	0,8 µM	Primer
b-cat LNA1	gc <b>CACTACCACAG</b> c-Phos	88°C	sense	0,8 µM	Blocker
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,25 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA, 1 x SYBRGreen, 5 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer sowie Blocker in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 45 Zyklen mit 10 s 95 °C / 5 s 74 °C / 15 s 68°C (Heizrate 20 °C/s).					

Tabelle 3.18: Bedingungen für *CTNFB1* Codon 41 LNA-clamp-PCR; fett: Codon 41; Großbuchstaben: LNA; PCR-Produktlänge: 226 bp

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
b-cat_s neu	ctgatttgatggagttggacatggc	65°C	sense	0,2 µM	Primer
b-cat_as neu	gctactgttcttgagtgaaggactga	67°C	antisense	0,8 µM	Primer
b-cat LNA2	gc <b>TCCTTCTCT</b> Gagt-Phos	86°C	sense	0,3 µM	Blocker
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,25 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA, 1 x SYBRGreen, 5 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer sowie Blocker in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 45 Zyklen mit 10 s 95 °C / 5 s 74 °C / 15 s 68°C (Heizrate 20 °C/s).					

Tabelle 3.19: Bedingungen für *CTNFB1* Codon 45 LNA-clamp-PCR ; fett: Codon 45; Großbuchstaben: LNA; PCR-Produktlänge: 226 bp

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
K-ras_s	ctgggtggagtatttgatagtg	57°C	sense	1 µM	Primer
K-ras R Ch	ggctctgcaccagtaaatgca	63°C	antisense	0,1 µM	Primer
K-ras LNA Rox1	Rox-tgccta <b>CGCCACCAG</b> c-Phos	88°C	antisense	0,5 µM	Blocker
K-ras fluo CH	cgccacaaaatgattctgaattagctgtatcgcaagg cact-Fluorescein	75°C	antisense	0,3 µM	Sonde
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 1,25 U FastStartTaq, 1 x FastStart-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA, 5 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer, Blocker sowie Sonden in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler <sup>®</sup> 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 45 Zyklen mit 2 s 95 °C / 10 s 70 °C / 15 s 60°C / 15 s 66°C (Heizrate 20 °C/s).					

Tabelle 3.20: Bedingungen für *K-ras* Codon 12 und 13 LNA-clamp-PCR; fett: Codon 12 und 13; Großbuchstaben: LNA; PCR-Produktlänge: 243 bp

Die Versuche mit einer Polymerase ohne Exonukleasefunktion wurden unter den in Tabelle 3.21 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Schmelztemperatur	Strang	Konzentration	Funktion
BRAF fw	tcctttacttactacacctcagata	60°C	sense	0,1 µM	Primer
BRAF rev	gaccttcaatgactttctagtaact	60°C	antisense	0,8 µM	Primer
BRAF LNA2	aGATTT <b>CACT</b> GTAGc-Phos	86°C	antisense	0,05 µM / 0,4 µM	Blocker
<b>PCR-Mix:</b> 20 µl enthielten 2 U KleinTaq, 1 x KleinTaq-Puffer, 0,2 mM Nukleotiden, 1,5 µg/µl BSA, 1 x SYBRGreen, 5 mM MgCl <sub>2</sub> und Primer sowie Blocker in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen.					
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im Mastercycler® ep <i>realplex</i> (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt. Nach 5 min Denaturierung folgten 45 Zyklen mit 10 s 95 °C / 10 s 70 °C / 10 s Gradient 56°C - 62°C / 20 s Gradient 68°C - 75°C (Heizrate 4 °C/s).					

Tabelle 3.21: Bedingungen für *BRAF* LNA-clamp-PCR mit LNA als Amplifikationsblocker mit Polymerase ohne Exonukleasefunktion; fett: Codon 600; Großbuchstaben: LNA; PCR-Produktlänge: 222 bp

## 4 Ergebnisse

Die mutierte DNA aus Tumorzellen in Stuhlproben liegt in einem hohen Hintergrund von DNA aus gesunden Zellen vor, die ebenfalls mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Ziel war die Entwicklung eines Nachweissystems für Punktmutationen, mit dem ein hohes Detektionslimit erzielt wird, d. h. mit dem Proben analysiert werden können, in denen die Wildtyp-DNA in hohem Überschuss vorliegt. Abbildung 4.1 stellt in einer Übersicht die durchzuführenden Arbeitsschritte dar.

Zuerst wurden Plasmidmodellsysteme erstellt, an denen die Methoden getestet und weiterentwickelt

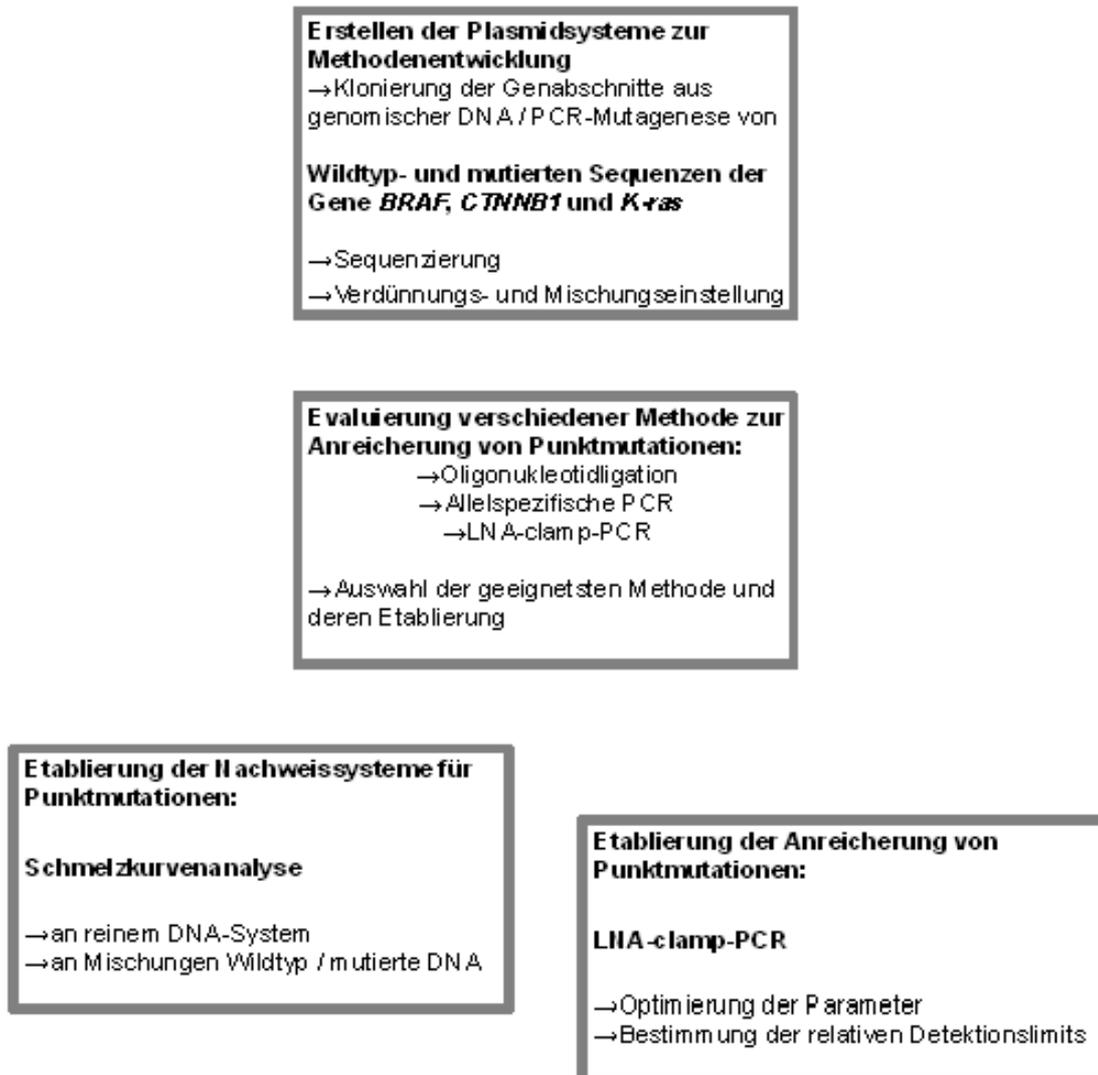


Abbildung 4.1: Übersichtgraphik der in dieser Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte zur Entwicklung eines Nachweissystems für im Unterschuss vorliegende mutierte Genfragmente werden konnten. Daran erfolgte der Vergleich von drei geeignet erscheinenden Anreicherungsverfahren für Punktmutationen tragende Gensequenzen. Die erfolgversprechendste Methode, die LNA-clamp-PCR, wurde weiter entwickelt und für den Nachweis von Mutationen in den Sequenzen *BRAF*, *CTNNB1* und *K-ras* optimiert. Für die Entwicklung eines Anreicherungsverfahrens war ein geeignetes Detektionssystem, die Schmelzkurvenanalyse von Hybridisierungssonden, erforderlich. Diese Analysemethode wurde zur Weiterentwicklung der LNA-clamp-PCR für alle drei Genfragmente etabliert.

## 4.1 Erstellen der Plasmidmodellsysteme

Als DNA-Template für die Etablierung und Optimierung der LNA-clamp-PCR-Methode wurden Plasmide mit insertierten Genfragmenten verwendet. Die Genfragmente entsprechen Wildtypsequenzen bzw. tragen Punktmutationen, die aus dem Markerset stammen. Die Verwendung von Plasmiden bietet die Vorteile der unbegrenzten Verfügbarkeit und der guten Quantifizierbarkeit gegenüber realer Stuhlproben. Es können definierte Mischungen hergestellt werden anhand derer die Eigenschaften der Methode untersucht werden können. Die Sequenzen aller verwendeten DNA-Template wurden zuvor mittels direkter DNA-Sequenzierung überprüft.

### Verdünnungen wurden mittels CT-Werten überprüft

Die zur Etablierung der Anreicherungsmethode verwendeten DNA-Template für Wildtyp und Mutante müssen in gleicher Kopienzahl vorliegen. Um dies sicherzustellen, wurden die hergestellten Plasmidlösungen in der „realtime“-PCR mit SYBRGreen eingesetzt und die erhaltenen CT-Werte verglichen. Dies ist notwendig, da die Quantifizierung über PicoGreen nicht exakt genug ist. Abbildung 4.2 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurven für *BRAF*. Jede Verdünnung wurde als Duplikat analysiert.

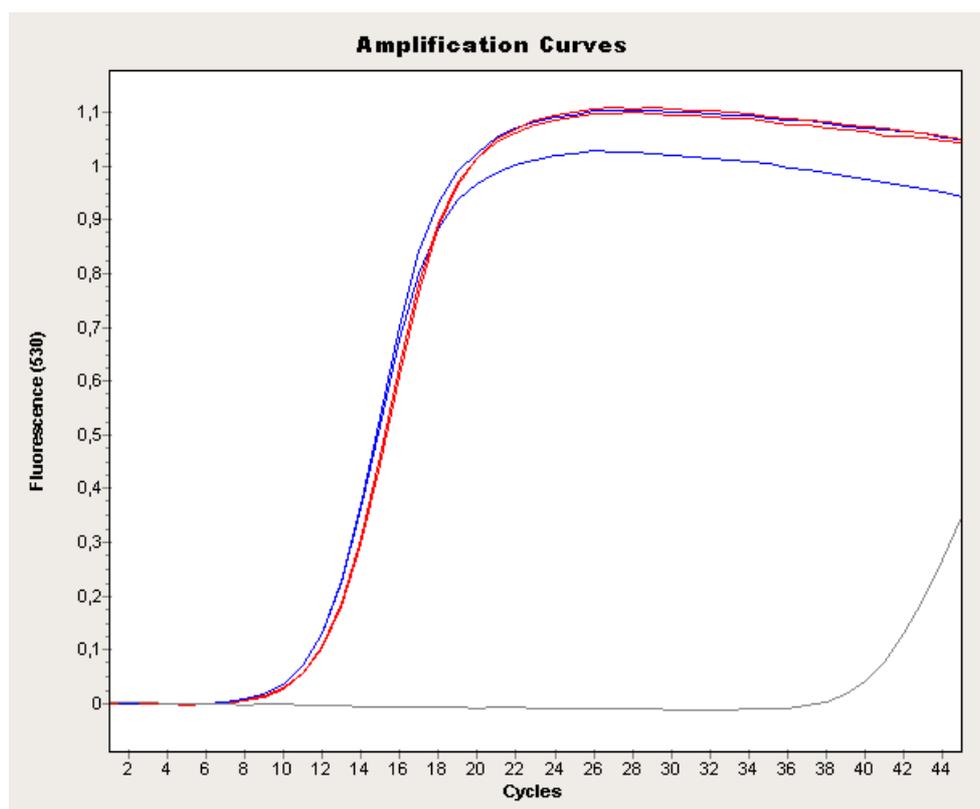


Abbildung 4.2: Beispielkurven von *BRAF* zur Überprüfung der Plasmidverdünnungen  
Die CT-Werte für das Wildtyp-Fragment (blau) und das mutierte Fragment (rot) stimmen überein. grau:  
Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)

Aufgrund der gleichen CT-Werte von Wildtyp und Mutante kann auf die gleiche Anzahl Ausgangskopien geschlossen werden. Es wurden CT-Wert-Differenzen zwischen Wildtyp und Mutante von  $\leq 1$  akzeptiert, wobei eine CT-Wert-Differenz von -1 für die Wildtyp-DNA auf die

doppelte Menge Ausgangs-DNA gegenüber der mutierten DNA schließen lässt. Da in den späteren Experimenten zur LNA-clamp-PCR Verhältnisse in der Potenz von 10 untersucht wurden, sind Abweichungen in diesem Bereich zu vernachlässigen.

Die Schwankungen innerhalb der Replikate zeigen Unterschiede von bis zu 0,8.

Die Plasmidmodellsysteme für die drei Genfragmente *BRAF*, *CTNNB1* und *K-ras* sind erfolgreich entwickelt worden und standen nun für die Evaluierung und Etablierung der Methoden zur Verfügung.

## **4.2 Evaluierung verschiedener Methoden zum Nachweis von Punktmutationen**

Es wurden drei Methoden hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit zur Anreicherung von im Unterschuss vorliegenden Punktmutationen überprüft: die Oligonukleotidligation, die Allelspezifische PCR und die LNA-clamp-PCR. Die Verfahren wurden am Plasmidsystem *BRAF* exemplarisch getestet.

### **4.2.1 Oligonukleotidligation**

Es konnte kein spezifischer Nachweis des mutierten Fragments erzielt werden. Im Gel war kein ligiertes Fragment sichtbar. Auch mit dem Wildtyp-Fragment wurde ein PCR-Produkt erhalten, welches wahrscheinlich auf Rückstände des Plasmids nach der Gelextraktion des Ligationsansatzes zurückzuführen ist. Aufgrund der Geldetektion bzw. der notwendigen Aufreinigung vor einer Detektion mittels PCR ist die Methode sehr arbeitsaufwendig und wurde deshalb nicht weiterentwickelt.

### **4.2.2 Allelspezifische PCR**

Die Allelspezifische PCR wurde mit dem mutationsspezifischen Vorwärtsprimer an Wildtyp- und mutiertem Fragment im „realtime-SYBRGreen“-Format durchgeführt. Die Amplifikation des Wildtyps sollte zusätzlich durch den Einsatz einer LNA-Sonde inhibiert werden (Abbildung 4.3).

Abbildung 4.3: Allelspezifische PCR für *BRAF*

Lage und Sequenzen des mutationsspezifischen Vorwärtsprimers und der LNA-Sonde. Auf dem Wildtyp-Fragment bildet der Primer eine Basenfehlpaarung, die zu einer Verhinderung der Amplifikation führt. Die zusätzliche Verwendung einer LNA-Sonde soll die Inhibition der Wildtypamplifikation verstärken. Blau: Primer; Rot: mutierte Base; Pink: Wildtypbase an der Position der Punktmutation; Grün: LNA-Sonde

Als Vergleich dienten Reaktionen mit einem Vorwärtsprimer (*BRAF* s2) strangaufwärts der Position der Punktmutation. Die erhaltenen CT-Werte sind in Tabelle 4.1 ausgewertet.

Vorwärtsprimer	CT-Wert Wildtyp-DNA	$\Delta$ CT Wildtyp-DNA	CT-Wert mutierte DNA	$\Delta$ CT mutierte DNA	$\Delta\Delta$ CT-Wert ( $\Delta$ CT Wildtyp - $\Delta$ CT mutiert)
<i>BRAF</i> s2	22,4		24,2		
<i>BRAF</i> s5	29,6	7,2	24,6	0,2	7,0
<i>BRAF</i> s5 mit Blocker	30,8	8,4	24,8	0,4	8,0

Tabelle 4.1: Allelspezifische PCR an *BRAF*: Auswertung der CT-Werte und CT-Wert-Differenzen. Als Referenz diente ein nicht allelspezifischer Primer *BRAF* s2. Zusätzlich wurde der allelspezifische Primer *BRAF* s5 in Kombination mit einem Blocker verwendet.

Der Einsatz des allelspezifischen Primers *BRAF* s5 führt zu einer Inhibition der Amplifikation des Wildtyps gegenüber der Mutante. Der  $\Delta\Delta$ CT-Wert beträgt 7,0, was etwa einer Inhibition um das 100-fache entspricht. Durch den Einsatz einer LNA-Sonde zusätzlich zu dem allelspezifischen Primer konnte keine nennenswerte Verbesserung erzielt werden. Darüber hinaus konnte die Amplifikation des Wildtyps nicht vollständig inhibiert werden. Dies könnte zu falsch positiven Ergebnissen führen. Durch die Verlängerung des an einem Wildtyp-Fragment gebundenen mutationsspezifischen Primers kommt es zum Einbau der mutierten Base. Diese PCR-Produkte sind anschließend nicht mehr von denen auf dem mutierten Fragment beruhenden zu unterscheiden. Aufgrund dieser Problematik wurde diese Methode nicht weiter etabliert.

### 4.3 Etablierung des Nachweissystems zur Punktmutationsdetektion: Schmelzkurvenanalyse

Ein schnelles und kostengünstiges Verfahren zur Detektion von Punktmutationen ist die Schmelzkurvenanalyse der Hybridisierungssonden im Rahmen einer „realtime“-PCR. In dieser Arbeit soll das Verfahren im Anschluss an die LNA-clamp-PCR eingesetzt werden, um die erzielte Anreicherung der mutierten Fragmente nachzuweisen. Über die Schmelzkurvenanalyse wird das Detektionslimit der entwickelten LNA-clamp-PCR-Systeme bestimmt. Dazu werden zunächst „realtime“-PCR-Systeme mit Hybridisierungssonden für die Genfragmente *BRAF*, *CTNNB1* und *K-ras* entwickelt. Die in den Genfragmenten vorkommenden Punktmutationen, die über die Schmelzkurven detektiert werden sollen, sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

#### 4.3.1 Entwicklung der Nachweisverfahren zur Punktmutationsdetektion

Zunächst wurden für jedes der drei Genfragmente *BRAF*, *CTNNB1* und *K-ras* ein Hybridisierungssondenpaar entworfen, mit dem die Wildtypsequenz von der mutierten Sequenz unterschieden werden kann. Die Unterscheidung fand dabei über den Schmelztemperaturunterschied statt, der entsteht, wenn sich innerhalb der Bindungsstelle der Sonde eine Basenfehlpaarung befindet. Dieser Temperaturunterschied muss so groß sein, dass in der Schmelzkurvenanalyse der beiden unterschiedlichen Sequenzen zwei voneinander unterscheidbare Schmelzpunktmaxima sichtbar sind.

Die Hybridisierungssondenpaare wurden so entworfen, dass der mutierte Sequenzbereich von der Akzeptorsonde überspannt wird. Um hier die größtmögliche Destabilisierung der Bindung bei einer Basenfehlpaarung und somit einen großen Schmelztemperaturunterschied zu erzielen, wurde die Basenfehlpaarung möglichst etwa in die Mitte der Sonde gelegt.

#### Punktmutationsnachweis für *CTNNB1*

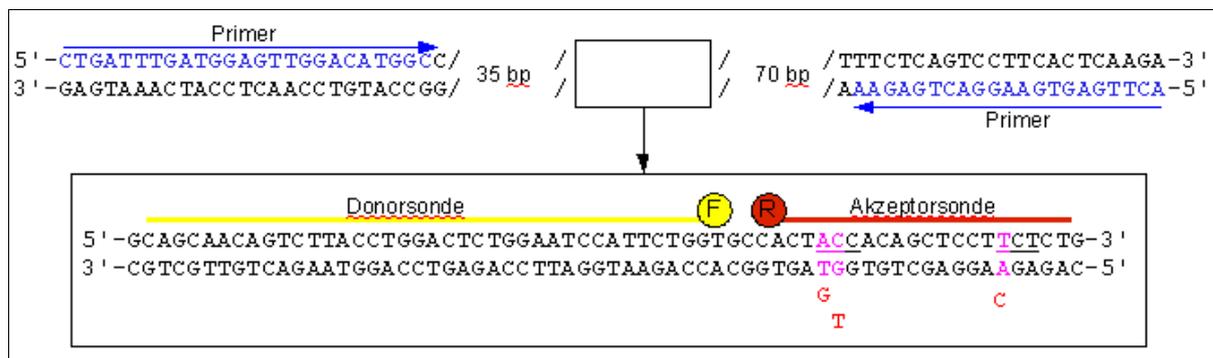


Abbildung 4.4: *CTNNB1*: Lage der Primer und Sonden zur Punktmutationsdetektion nach LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker

Dargestellt sind beide Stränge der Wildtypsequenz. Die drei in diesem Gen untersuchten Punktmutationen in den Codons 41 bzw. 45 wurden mit der gleichen Akzeptorsonde detektiert. Blau: Sequenz der Primer; Pink: Wildtypbasen an Position der Punktmutation; Rot: mutierte Basen (sense-Strang); Unterstrichen: Codons 41 und 45; F: 6FAM-Markierung; R: Rox-Markierung

Für das Genfragment *CTNNB1* war es das Ziel, drei Punktmutationen nachzuweisen (Tabelle 4.2). Diese Mutationen befinden sich in zwei Codons: Codon 41 und Codon 45. Für alle drei Punktmutationen sollte das gleiche Sondenpaar verwendet werden (Abbildung 4.4).

Die „realtime“-PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse wurde mit der Wildtypsequenz und den drei mutierten Sequenzen durchgeführt. Beispielhaft für alle entwickelten Punktmutationsdetektionsverfahren sind in Abbildung 4.5 die Schmelzkurven für das Genfragment *CTNNB1* dargestellt.

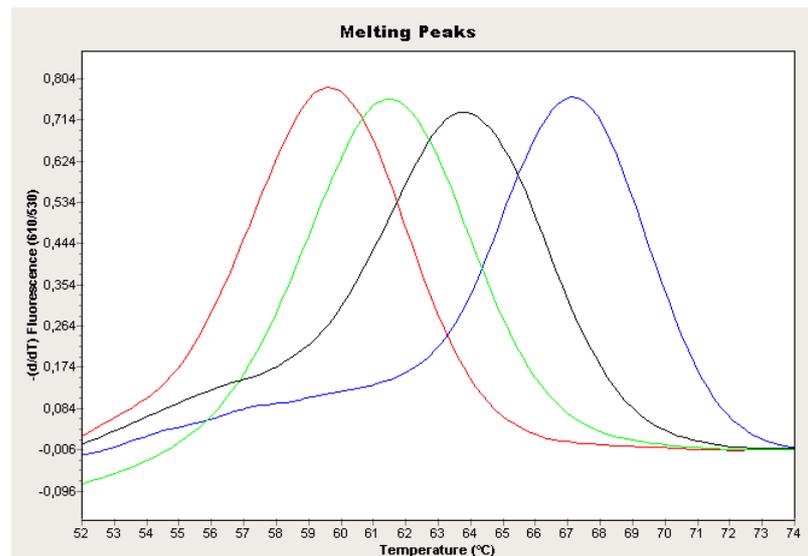


Abbildung 4.5: *CTNNB1*: Schmelzkurven der Hybridisierungssonden zur Punktmutationsdetektion für das *CTNNB1* Wildtyp-Fragment (blau) und die Mutanten Codon 41 ACC-->ATC (rot), Codon 41 ACC-->GCC (grün) und Codon 45 TCT-->CCT (schwarz). Die Schmelzkurven sind anhand ihrer Schmelztemperaturmaxima voneinander unterscheidbar.

Die Schmelztemperaturmaxima (siehe auch Tabelle 4.2) des Wildtyps und der drei Mutanten sind bei Verwendung des gleichen Sondenpaares unterscheidbar. Den höchsten Schmelzpunkt zeigt das Wildtyp-Fragment, welches der Sequenz der Akzeptorsonde entspricht. Das entwickelte System ist zur Detektion von *CTNNB1*-Punktmutationen geeignet.

### **Punktmutationsnachweis für BRAF**

Im Genfragment *BRAF* sollte eine Punktmutation im Codon 600 detektiert werden (Tabelle 4.2).

Für *BRAF* wurden zwei unterschiedliche LNA-clamp-PCR-Systeme entworfen, LNA als Primerblocker bzw. als Amplifikationsblocker. Für jede Variante wurde ein Punktmutationsnachweissystem entworfen: Variante A (Abbildung 4.6) bzw. Variante B (Abbildung 4.7):

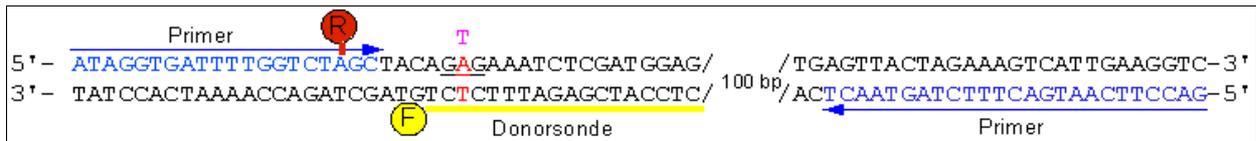


Abbildung 4.6: *BRAF*: Lage der Primer und Sonden zur Punktmutationsdetektion nach LNA-clamp-PCR mit Primerblocker

Variante A: Dargestellt sind beide Stränge der mutierten Sequenz. Der Vorwärtsprimer trägt eine Rox-Markierung drei Basenpaare vom 3'-Ende entfernt und dient somit gleichzeitig als Akzeptorsonde. Blau: Sequenz der Primer; Pink: Wildtypbasen an Position der Punktmutation; Rot: mutierte Basen, Unterstrichen: Codon 600; F: Fluoreszein-Markierung; R: Rox-Markierung

Variante A (Abbildung 4.6): Die PCR-Produkte aus der LNA-clamp-PCR wurden aufgereinigt, um den Blocker zu entfernen, und mit der Donorsonde gemischt. Die Schmelzkurvenanalyse wurde in diesem Ansatz direkt ohne eine weitere Amplifikation durchgeführt.

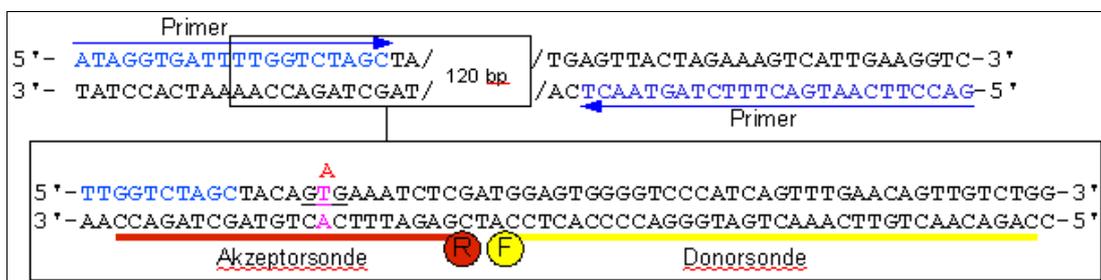


Abbildung 4.7: *BRAF*: Lage der Primer und Sonden zur Punktmutationsdetektion nach LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker

Variante B: Dargestellt sind beide Stränge der Wildtypsequenz. Blau: Sequenz der Primer; Pink: Wildtypbase an Position der Punktmutation; Rot: mutierte Basen; Unterstrichen: Codon 600; F: 6FAM-Markierung; R: Rox-Markierung

Mit den Primern und Sonden für Variante B (Abbildung 4.7) wurde eine „realtime“-PCR durchgeführt. Zur Entwicklung des Systems wurde das Plasmidmodellsystem benutzt, welches entweder ein Wildtyp- oder ein mutiertes Genfragment trägt. Zur späteren Analyse der PCR-Produkte aus der LNA-clamp-PCR wurden die Produkte in eine zweite PCR mit den Primern und Sonden aus Abbildung 4.7 eingesetzt.

Das Schmelztemperaturmaximum des Wildtyp-Fragments ist deutlich von dem des mutierten Fragments zu unterscheiden (Tabelle 4.2).

### **Punktmutationsnachweis für *K-ras***

Bei dem Genfragment *K-ras* sollten mehrere Punktmutationen mit dem gleichen Sondenpaar analysiert werden (Tabelle 4.2). Die Lage des Sondenpaares und der Primer ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

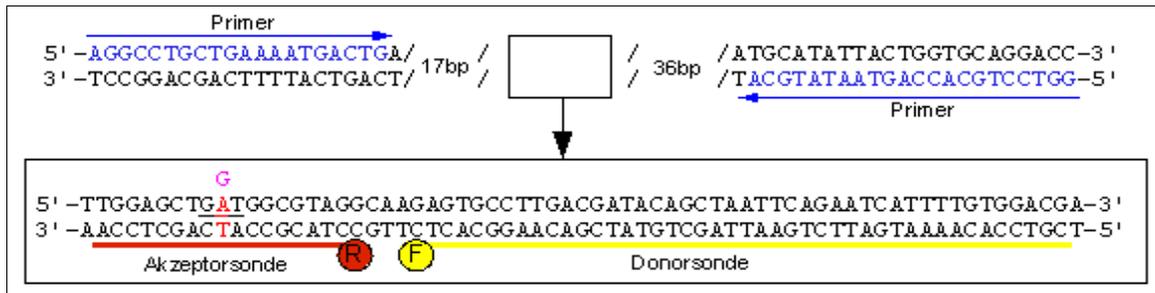


Abbildung 4.8: *K-ras*: Lage der Primer und Sonden zur Punktmutationsdetektion nach LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker

Dargestellt sind beide Stränge der mutierten Sequenz. Blau: Sequenz der Primer; Pink: Wildtypbase an Position der Punktmutation; Rot: mutierte Basen; Unterstrichen: Codon 12; F: Fluoreszein-Markierung; R: Rox-Markierung

Die Schmelzkurvenanalyse zeigt für vier Mutanten und den Wildtyp ein jeweils anderes Temperaturmaximum (Tabelle 4.2).

### **Alle mutierten Fragmente sind anhand ihrer Schmelzkurven vom Wildtyp-Fragment unterscheidbar**

Eine Übersicht über die Schmelztemperaturmaxima der einzelnen Sequenzen ist in Tabelle 4.2 aufgeführt. Für jedes der drei Genfragmente und den dazugehörigen Mutanten konnte ein Punktmutationsdetektionssystem etabliert werden, welches zur Analyse der Ergebnisse der LNA-clamp-PCRs eingesetzt werden kann.

Gen	Mutation	Schmelztemperatur [°C]	$\Delta T^{\circ}\text{C}$
<i>BRAF</i>	Wildtyp	65	
<i>BRAF</i>	Cd600 GTG --> GAG	61	4
<i>CTNNB1</i>	Wildtyp	67	
<i>CTNNB1</i>	Cd45 TCT --> CCT	63	4
<i>CTNNB1</i>	Cd41 ACC --> GCC	61	2
<i>CTNNB1</i>	Cd41ACC --> ATC	60	1
<i>K-ras</i>	Cd12 GGT --> GAT	65	
<i>K-ras</i>	Wildtyp	61	4
<i>K-ras</i>	Cd12 GGT --> GCT	57	5
<i>K-ras</i>	Cd12 GGT --> TGT	55	2
<i>K-ras</i>	Cd13 GGC --> GAC	51	3

Tabelle 4.2: Schmelztemperaturmaxima und deren Unterschiede  $\Delta T^{\circ}\text{C}$  für Wildtyp-Fragment und entsprechende Mutanten. Die Temperaturunterschiede wurden zum jeweils benachbarten Schmelzpunktmaximum berechnet. Alle Sequenzen sind anhand der Schmelztemperatur unterscheidbar.

### **4.3.2 Punktmutationsdetektion in Sequenzmischungen**

Die Schmelzkurvenanalyse zur Punktmutationsdetektion sollte eingesetzt werden, um mutierte Fragmente in einer Mischung mit Wildtyp-Fragmenten nachzuweisen. Die in den reinen Systemen entwickelten Nachweisverfahren sollten nun auf ihre Anwendbarkeit in Mischungen überprüft werden. Dies wurde beispielhaft an dem Genfragment *K-ras* gezeigt. Es war zu erwarten, dass

Mischungen von zwei Sequenzen entweder beide Schmelztemperaturmaxima oder ein Schmelztemperaturmaximum, das zwischen dem des Wildtyps und der Mutante liegt, zeigen.

Zudem wurde auch das relative Detektionslimit der Schmelzkurvenanalyse bestimmt, d. h. das Mischungsverhältnis von zwei Sequenzen, bei welchem es noch möglich ist, das im Unterschuss vorliegende Fragment in der Schmelzkurve zu detektieren.

Es wurden Mischungen von in Codon12 mutierter Sequenz (GGT --> GAT) mit Wildtypsequenz in den Verhältnissen 1:1, 1:5 und 1:10 mit der zuvor entwickelten „realtime“-PCR analysiert. Als Kontrollen wurde reines Wildtyp-Fragment und reine Mutante verwendet. Die erhaltenen Schmelzkurven sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

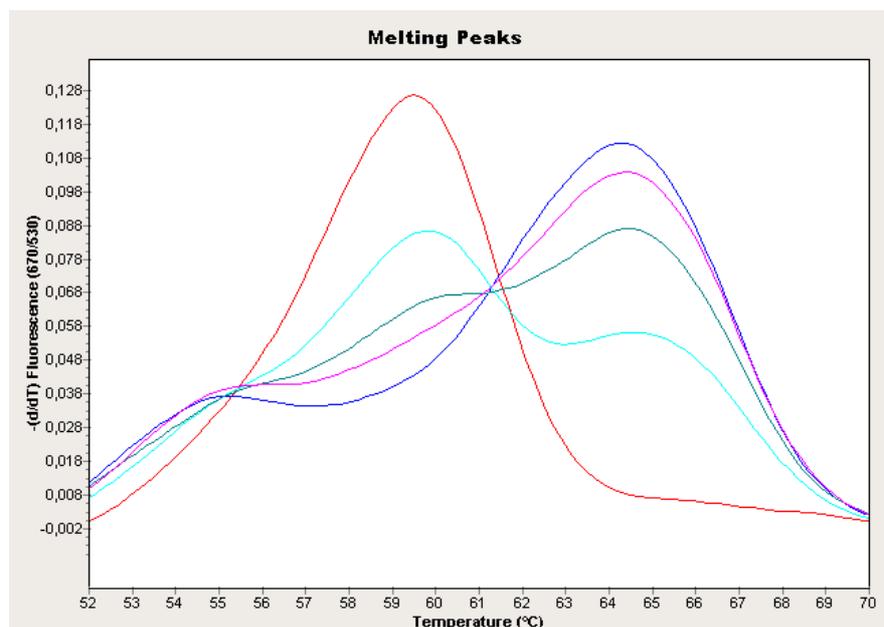


Abbildung 4.9: *K-ras*: Schmelzkurven von Mischungen aus Wildtyp-DNA und mutierter DNA (Codon 12 GGT->GAT)

Als Kontrolle wurde reine Wildtyp-DNA (blau) und mutiertes Fragment (rot) eingesetzt. Die Mischungen 1:1 (hellblau) und 1:5 (grün) zeigen die Temperaturmaxima von Mutante und Wildtyp, bei der Mischung 1:10 (pink) ist nur noch das Maximum des Wildtyps detektierbar. Das relative Detektionslimit der Schmelzkurvenanalyse beträgt 1:5.

In der Schmelzkurve dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenzänderung über die Temperatur ( $-dF/dT$ ), ein Wendepunkt wird also als ein Maximum dargestellt. Dieses Maximum stellt die Schmelztemperatur der Sonde dar. Die Berechnung erfolgt automatisch durch die LightCycler Software. Die Auswertung der Schmelzkurven wurde visuell vorgenommen. Dabei wurde ein Maximum unabhängig von dessen Höhe als positives Ergebnis für die Sequenz gewertet, die bei dieser Temperatur ihr Schmelzpunktmaximum zeigt. Demnach zeigen die Schmelzkurven in Abbildung 4.9 für die Mischungen 1:1 (hellblau) und 1:5 (grün) jeweils zwei Maxima, also die Anwesenheit von Mutante und Wildtyp-Fragment im PCR-Produkt, während für die Mischung 1:10 (pink) nur ein Maximum bei der Schmelztemperatur des Wildtyps zu detektieren ist. Das relative Detektionslimit der Schmelzkurvenanalyse für *K-ras* liegt bei ca. 1:5 und entspricht damit den Erwartungen. Es ist davon auszugehen, dass die Detektionslimits von Schmelzkurven auch für andere Genfragmente in diesem Bereich liegen.

### 4.3.3 Amplifikations- und Schmelzkurven in Anwesenheit von Blocker

Bei den ersten Versuchen unter Verwendung von Sonden und Blocker im gleichen PCR-Ansatz stellte sich heraus, dass dabei keine auswertbaren Schmelzkurven erhalten wurden. Dieses Problem konnte trotz Optimierungsversuche im Rahmen dieser Arbeit nicht behoben werden. Da die höchste Priorität auf dem Gelingen der Anreicherung von mutierten Fragmenten lag und nicht auf der Detektion der Punktmutationen im gleichen Lauf mit der Anreicherung, wurde die Schmelzkurvenanalyse von der LNA-clamp-PCR abgekoppelt. Sie wurde anschließend in einer separaten „realtime“-PCR mit den PCR-Produkten als Template unter Verwendung der entwickelten Hybridisierungs sonden durchgeführt. Diese Reamplifikationen fanden als „seminested“-PCRs statt.

### 4.3.4 Unterschiedliche Schmelztemperaturen ohne und mit Blocker

Es wurde im Laufe dieser Arbeit festgestellt, dass sich die Reamplifikate von Wildtypsequenzen in der Schmelztemperatur unterschieden, je nachdem, ob in der ersten PCR ein LNA-Blocker eingesetzt wurde oder nicht. Mutierte Sequenzen zeigen diesen Unterschied nicht oder nur in einem zu vernachlässigendem Ausmaß. In Tabelle 4.3 sind die Schmelztemperaturunterschiede aufgeführt.

Bezeichnung	Schmelztemperatur ohne Blocker [°C]	Schmelztemperatur mit Blocker [°C]	$\Delta T^{\circ}\text{C}$
<i>BRAF</i> Wildtyp	65	58	- 7
<i>BRAF</i> Cd600 GAG	61	61	0
<i>CTNNB1</i> Wildtyp	67	59	- 8
<i>CTNNB1</i> Cd45 CCT	63	63	0
<i>CTNNB1</i> Cd41 GCC	61	61	0
<i>CTNNB1</i> Cd41 ATC	60	60	0
<i>K-ras</i> Cd12 GAT	65	66	+ 1
<i>K-ras</i> Wildtyp	61	53	- 8
<i>K-ras</i> Cd12 GCT	57	57	0
<i>K-ras</i> Cd12 TGT	55	55	0
<i>K-ras</i> Cd13 GAC	51	52	+ 1

Tabelle 4.3: Schmelztemperaturmaxima der reamplifizierten Sequenzen in Abhängigkeit von der Verwendung von Blocker in der ersten PCR. Die Wildtyp-Fragmente zeigen Unterschiede ( $\Delta T^{\circ}\text{C}$ ) der Temperaturmaxima.

Die Sonden konnten dennoch zur Differenzierung zwischen Wildtyp und Mutante verwendet werden, da die Schmelztemperaturmaxima weiterhin zu unterscheiden waren. Eine Ausnahme stellt die Detektion von *CTNNB1* Codon 41 ATC dar. Diese Mutante konnte nur anhand einer Sequenzierung identifiziert werden.

#### 4.4 Etablierung der Methode zur Anreicherung von Punktmutationen: LNA-clamp-PCR

Das in dieser Arbeit zu entwickelnde Nachweissystem für Punktmutationen soll später zur Diagnostik von Darmkrebs oder Darmkrebsvorläufern in Stuhlproben zum Einsatz kommen. In diesen Proben liegt die mutierte, von Darmkrebszellen stammende DNA gegenüber der von gesunden Zellen stammenden DNA im Unterschuss vor. Um eine Detektion dieser Fragmente trotzdem zu ermöglichen, müssen sie gegenüber den Wildtyp-Fragmenten angereichert werden. Dazu wurde das Verfahren der LNA-clamp-PCR entwickelt. Dabei wird eine PCR in Anwesenheit eines LNA-Blockers durchgeführt, der die Vermehrung des Wildtyp-Fragments verhindern, die des mutierten Fragments

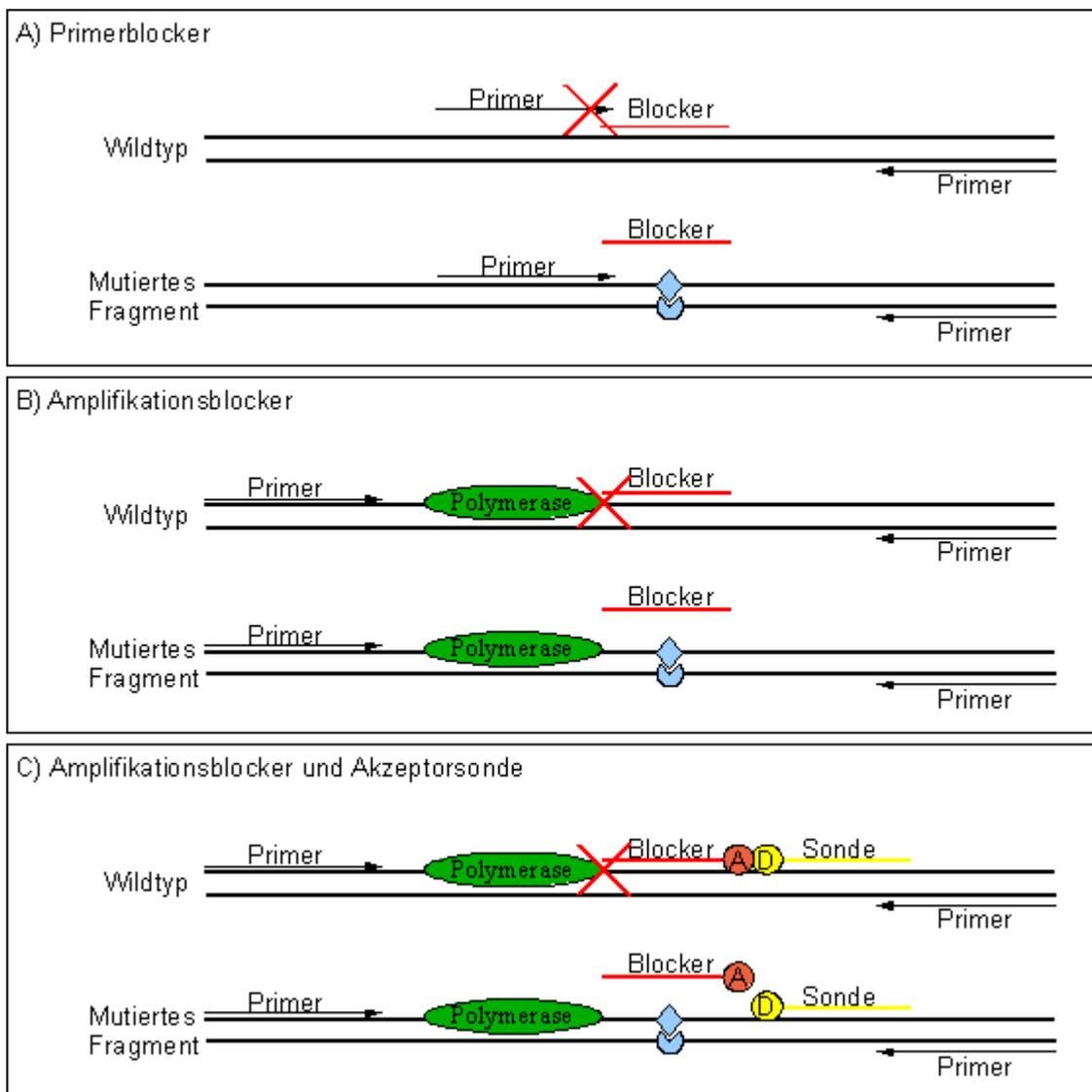


Abbildung 4.10: Versuchsprinzipien der LNA-clamp-PCR

A) Blocker als Primerblocker: die Bindung des Primers an dem Wildtyp-Fragment wird durch den Blocker verhindert

B) Blocker als Amplifikationsblocker: durch die Bindung des Blockers an dem Wildtyp-Fragment wird die Verlängerung des Stranges durch die Polymerase verhindert.

C) Blocker als Amplifikationsblocker und Akzeptorsonde: Blockerprinzip wie bei B), zusätzlich dient der Blocker während der Schmelzkurvenanalyse als Akzeptorsonde (A); (D): Donorsonde

aber nicht beeinflussen soll. Der Blocker kann so eingesetzt werden, dass er entweder die Primerbindungsstelle blockiert (Abbildung 4.10: Variante A) oder die Verlängerung des DNA-Stranges durch die Polymerase verhindert (Abbildung 4.10: Variante B). Bei Variante A überlappt das 3'-Ende des Primers mit dem 5'-Ende des Blockers. Die Bindung des Primers an die Wildtypsequenz und somit deren Amplifikation wird verhindert. Der Blocker selbst ist aufgrund der Phosphorylierung des 3'-Endes nicht verlängerbar. An dem mutierten Fragment bindet der Blocker aufgrund der Basenfehlpaarung bei der während der Primerbindung herrschenden Temperatur nicht. Die Mutante wird ungehindert amplifiziert. Bei Variante B wird der Blocker zwischen den beiden Primern positioniert und verhindert durch seine hohe Affinität zum Komplementärstrang dessen Verlängerung. Erreicht die Polymerase den Blocker, wird sie an der weiteren Synthese gehindert. Ist eine Punktmutation vorhanden, bindet der Blocker nicht an dem DNA-Strang und die Amplifikation findet statt. Beide Varianten wurden in dieser Arbeit getestet.

Bei dem Einsatz als Amplifikationsblocker wurde außerdem versucht, den Blocker gleichzeitig als Akzeptorsonde zu verwenden (Abbildung 4.10: Variante C). Dabei soll der Blocker während der Schmelzkurvenanalyse auch an dem mutierten Fragment binden. Diese Bindung findet aufgrund der Basenfehlpaarung nur bei niedrigen Temperaturen unterhalb der Elongationstemperatur statt.

### **Bestimmung der Blockereffizienz**

Die entscheidende Komponente in der LNA-clamp-PCR ist der Blocker. Um das Blockierungsverhalten zu quantifizieren, wurde eine Kennzahl, die Blockereffizienz, eingeführt. Zu deren Bestimmung wurden die CT-Werte aus der LNA-clamp-PCR mit SYBRGreen verwendet. Die Versuche dazu wurden an reinen Sequenzen, also entweder an einem Wildtyp-Fragment oder an einem mutierten Fragment durchgeführt.

Es wurden nur CT-Werte des gleichen Laufs miteinander verglichen, da Läufe mit verschiedenen Bedingungen aufgrund unterschiedlicher PCR-Effizienzen nicht vergleichbar waren. Bestimmt wurden jeweils die CT-Werte für das Wildtyp-Fragment und das mutierte Fragment sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Blocker. Für beide Fragmente wurde die Differenz der CT-Werte  $\Delta CT$  ohne und mit Blocker gebildet. Die Differenz dieser beiden  $\Delta CT$ -Werte wiederum ergibt die Blockereffizienz. Beispielwerte für die Berechnung der Blockereffizienz aus einem Experiment für *BRAF* sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Die Parameter der LNA-clamp-PCR mussten so optimiert werden, dass die Unterdrückung der Wildtyp-DNA besonders hoch und die ungewollte Inhibition der mutierten DNA gleichzeitig möglichst niedrig war. Das spiegelt sich in einem möglichst großen Wert für die Blockereffizienz wider. Die Amplifikation der Wildtypsequenz kann nie ganz ausgeschlossen werden, da es sich bei der Bindung zwischen Blocker und DNA-Templat um eine Gleichgewichtsreaktion handelt.

	CT-Wert Wildtyp-DNA	$\Delta$ CT Wildtyp- DNA	CT-Wert mutierte DNA	$\Delta$ CT mutierte DNA	Blockereffizienz $\Delta\Delta$ CT-Wert ( $\Delta$ CT Wildtyp - $\Delta$ CT mutiert)
Ohne Blocker	24,9	-	23,9	-	-
Mit Blocker	32,3	7,4	24,5	0,6	6,8

Tabelle 4.4: Beispielwerte für die Berechnung der Blockereffizienz

### Temperatur-Zeit-Profil für LNA-clamp-PCR

Eine PCR wird im wesentlichen durch ihr Temperatur-Zeit-Profil bestimmt. Herkömmlich besteht die Reaktion aus drei Stufen, der Denaturierung des DNA-Stranges, dem Annealing der Primer und der Extension des DNA-Templats. Für die LNA-clamp-PCR wurde ein 4-Stufen-Temperatur-Zeit-Profil gewählt. Die zusätzliche Stufe zwischen Denaturierung und Primerbindung soll die Bindung des Blockers bei einer Temperatur über der Primerbindungstemperatur ermöglichen. Damit soll verhindert werden, dass ein Primer bereits vor dem Blocker gebunden hat und es somit zur Amplifikation von ungeblocktem Wildtyp kommt.

In dieser Arbeit wurden in erster Linie die Temperaturen variiert. Die Annealingtemperatur ist von der Primerschmelztemperatur abhängig und wurde für jedes Primerpaar empirisch bestimmt. Sie sollte möglichst niedrig sein, um zu gewährleisten, dass der Blocker während dieser Phase auf der Wildtypsequenz gebunden hatte und so die Amplifikation verhinderte.

Die Elongationstemperatur ist so zu wählen, dass der Blocker auf dem Wildtyp-Fragment gebunden bleibt jedoch nicht auf dem mutierten Fragment. Je niedriger diese Temperatur ist, desto sicherer ist das Wildtyp-Fragment geblockt. Bei einer zu niedrigen Elongationstemperatur wird auch das mutierte Fragment inhibiert. Gleiches gilt für die Blockerbindungstemperatur.

#### 4.4.1 LNA als Primerblocker bei *BRAF*

Am Genfragment *BRAF* wurde der Einsatz der LNA als Primerblocker getestet (Abbildung 4.10, Variante A). In Abbildung 4.11 ist die Lage des Blockers und der Primer und deren Sequenzen dargestellt. Der Blocker bindet an dem Gegenstrang der Wildtypsequenz. Liegt die Mutation im Codon 600 GTG --> GAG vor, entsteht eine T-T Basenfehlpaarung zwischen DNA und Blocker.

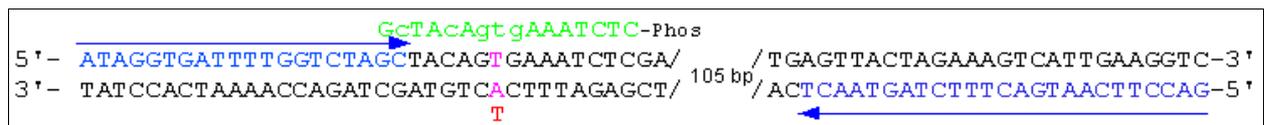


Abbildung 4.11: *BRAF*: LNA als Primerblocker: Positionen und Sequenzen des Blockers und der Primer  
Dargestellt sind die beiden Stränge der Wildtypsequenz. Der Blocker bindet an die Wildtypsequenz und konkurriert mit dem Primer um die Bindungsstelle. Durch die Punktmutation wird diese Bindung destabilisiert und der Primer kann binden. Pink: Wildtypbasen an Position der Punktmutation; Rot: mutierte Base; Grün: Blockersequenz; Kleinbuchstaben: LNA-Monomere; Blau: Primersequenz

Der Blocker wurde auf den gleichen Strang gelegt wie die Sonden, die später zur Detektion verwendet werden. Damit sollte verhindert werden, dass Blocker und Sonde zueinander komplementär sind und aneinander binden können. Dadurch würden die Sonden nicht mehr zur Detektion zur Verfügung stehen.

Die Schmelztemperatur des Blockers muss höher sein als die des Primers, um zu gewährleisten, dass der Blocker bei dem Primerbindungsschritt gebunden ist. Es wurde ein Vorwärtsprimer mit einer Schmelztemperatur von 56°C entworfen. Der verwendete Blocker hatte eine Schmelztemperatur von 64°C und überlappte mit 3 Basen das 3'-Ende des Vorwärtsprimers. Zwei dieser Basen waren LNA-Monomere, um eine möglichst feste Bindung in diesem Bereich zu erzielen.

### **Optimierung der Parameter**

Die beschriebene Reaktion wurde durchgeführt und dabei die Parameter Annealingtemperatur, Primerkonzentration und Polymerasemenge variiert. Die Blockerkonzentration von 2 µM, die Blockerbindungstemperatur von 68°C und die Elongationstemperatur von 72°C wurden konstant gehalten. Die erzielten Blockereffizienzen sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Annealingtemperatur	Primerkonzentration	Polymerasemenge	Blockereffizienz $\Delta\Delta CT$
64°C	0,5 µM	0,125 U/µl	1,1
62°C	0,5 µM	0,125 U/µl	2,1
60°C	0,5 µM	0,125 U/µl	2,8
60°C	0,2 µM	0,125 U/µl	6,0
60°C	0,2 µM	0,075 U/µl	6,8

Tabelle 4.5: Blockereffizienz  $\Delta\Delta CT$  für verschiedene Parameter

Die größte Auswirkung auf die Blockereffizienz wurde mit der Verringerung der Primerkonzentration von 0,5 µM auf 0,2 µM erzielt. Die Veränderung der Annealingtemperatur und der Polymerasemenge hatten dagegen nur einen geringen Effekt. Es wurde mit einer Annealingtemperatur von 60°C, einer Primerkonzentration von 0,2 µM und einer Polymerasemenge von 0,075 U/µl weitergearbeitet.

### **Bestimmung des Detektionslimits**

Im nächsten Schritt wurde die LNA-clamp-PCR mit den optimierten Bedingungen zur Analyse von Mischungen von *BRAF* Wildtyp und Mutante Cd 600 GAG im Verhältnis von 1:10, 1:50 und 1:100 angewendet, um das Detektionslimit zu bestimmen. Die erhaltenen Schmelzkurven sind in Abbildung 4.12 dargestellt.

Die Mischungen 1:50 (pink) und 1:100 (grün) zeigen zwei Schmelztemperaturmaxima, d. h. Sie enthalten sowohl Wildtyp-Fragment als auch Mutante. Das unter den verwendeten Bedingungen erzielte Detektionslimit beträgt mindestens 1:100. Da diese Schmelzkurve bereits ein deutliches Maximum für die Wildtypsequenz zeigt, ist kein signifikant höheres Detektionslimit zu erwarten.

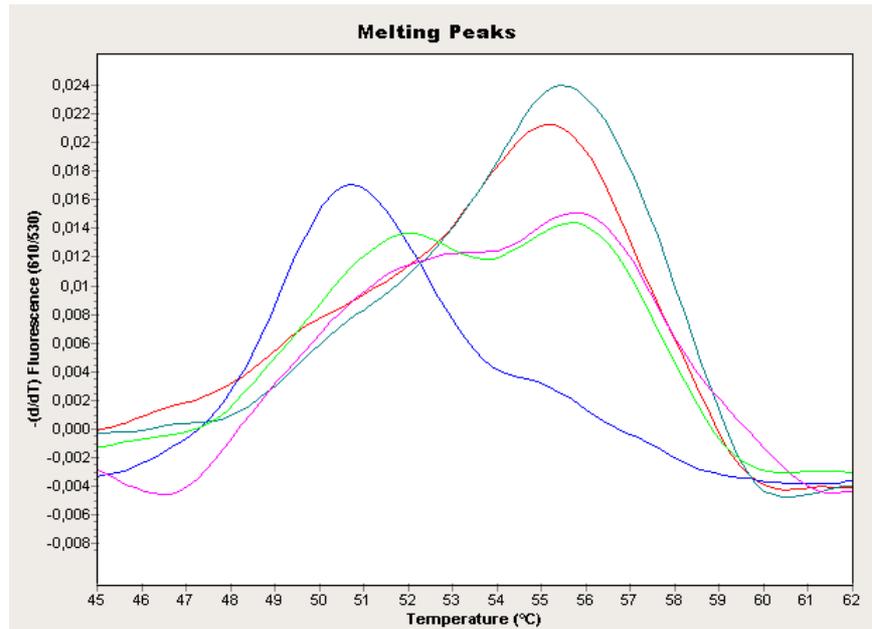


Abbildung 4.12: *BRAF*: LNA-clamp-PCR mit Primerblocker: Schmelzkurven zur Bestimmung des Detektionslimits. Das Wildtyp-Fragment (blau) und das mutierte Fragment Cd 600 GTG → GAG (rot) sind anhand ihrer Schmelztemperaturmaxima unterscheidbar. Die Mischung 1:10 (türkis) zeigt nur ein Maximum, welches dem der Mutanten entspricht. Die Mischungen 1:50 (pink) und 1:100 (grün) zeigen neben dem Maximum des Wildtyps auch das der Mutanten. Das Detektionslimit beträgt mindestens 1:100.

#### 4.4.2 LNA als Amplifikationsblocker bei *BRAF*

Die LNA-clamp-PCR unter Verwendung von LNA als Amplifikationsblocker (Abbildung 4.10, Variante B) wurde ebenfalls für das Genfragment *BRAF* etabliert. Die Lage des Blockers und der Primer und die entsprechenden Sequenzen sind in (Abbildung 4.13) dargestellt.



Abbildung 4.13: *BRAF*: LNA als Amplifikationsblocker: Positionen und Sequenzen des Blockers und der Primer. Dargestellt sind die beiden Stränge der Wildtypsequenz. Der Blocker bindet an die Wildtypsequenz und verhindert die Verlängerung durch die Polymerase. Durch die Punktmutation wird diese Bindung destabilisiert und die Amplifikation findet statt. Pink: Wildtypbasen an Position der Punktmutation; Rot: mutierte Base; Kleinbuchstaben: LNA-Monomere; Grün: Blockersequenz; Blau: Primersequenz.

## Optimierung der Parameter

### Einfluss der Blockerkonzentration

Es wurden Mutante – Wildtyp – Mischungen in den Verhältnissen 1:100, 1:1000 und 1:10 000 mit Blockerkonzentrationen von 0,4  $\mu\text{M}$ , 0,8  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  getestet. Als Kontrollen wurden jeweils 10 Millionen Kopien des Wildtyp-Fragments und des mutierten Fragments eingesetzt. Es wurde das Temperaturprogramm Nummer 7 (Tabelle 4.7) mit einer Elongationstemperatur von 73°C verwendet. Die Schmelzkurven mit 0,4  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Blocker für die Mischungen 1:1000 und 1:10 000 sind in Abbildung 4.14 dargestellt.

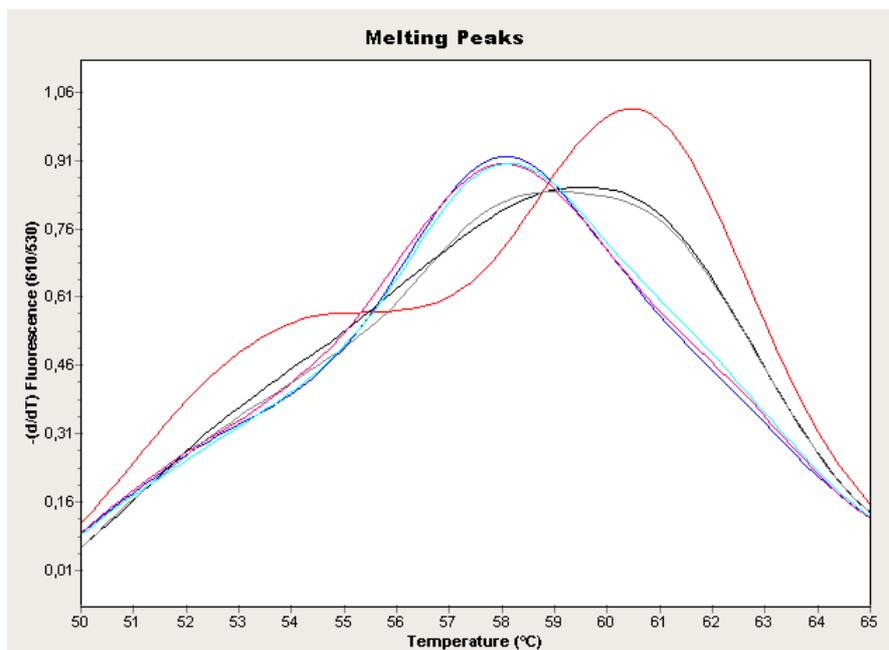


Abbildung 4.14: BRAF: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Einfluss der Blockerkonzentration auf das Detektionslimit

Dargestellt sind die Schmelzkurven für die Blockerkonzentrationen 0,4  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  mit den Mischungen 1:1000 (schwarz bzw. grau) und 1:10 000 (pink bzw. hellblau). Als Kontrollen wurden die reinen Plasmide für Wildtyp (blau) bzw. Mutante Cd 600 GTG --> GAG (rot) eingesetzt. Mit beiden Blockerkonzentrationen wird das gleiche Detektionslimit von 1:1000 erzielt.

Mit allen getesteten Blockerkonzentrationen wurde ein relatives Detektionslimit von 1:1000 erreicht. Obwohl die Blockermenge mehr als verdoppelt wurde, ist keine Veränderung des Detektionslimits festzustellen.

### Einfluss des Temperatur-Profiles

Die Blockereffizienz wurde in Abhängigkeit des Temperatur-Profiles bestimmt (Tabelle 4.6). Dazu wurden „realtime-SYBRGreen“-PCRs mit jeweils 10 Millionen Kopien des Wildtyp-Fragments und des mutierten Fragments durchgeführt. Die Stufe für die Blockerbindung wurde mit 70°C konstant gehalten. Die Blockerkonzentration betrug 0,8  $\mu\text{M}$ .

Programmnummer	Annealingtemperatur	Elongationstemperatur	$\Delta$ CT Wildtyp	$\Delta$ CT Mutante	Blockereffizienz $\Delta\Delta$ CT-Wert
1	56°C	65°C	13,7	8,3	5,2
2	57°C	66°C	13,1	3,4	9,7
3	58°C	67°C	12,8	3,4	9,3
4	60°C	67°C	12,7	3,2	9,5
5	60°C	69°C	12,0	2,4	9,6
6	61°C	70°C	12,3	1,4	10,8

Tabelle 4.6: BRAF LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Blockereffizienzen bei verschiedenen Temperaturprofilen

Die höchste Blockereffizienz wurde mit Programm Nummer 6 bei einer Annealingtemperatur von 61°C und einer Elongationstemperatur von 70°C erzielt. Der größte Einfluss auf die Blockereffizienz wurde durch die Erhöhung der Annealingtemperatur von 56°C auf 57°C und der Elongationstemperatur von 65°C auf 66°C erzielt. Diese Erhöhung ist vor allem auf die Veränderung des  $\Delta$  CT -Wertes für die Mutante zurückzuführen, während diese Änderungen keinen großen Einfluss auf die Amplifikation des Wildtyps haben.

In den nächsten Versuchen wurde eine weitere Erhöhung der Elongationstemperatur bei der Analyse von Wildtyp-Mutante-Mischungen getestet. Die Programme Nummer 1, 4 und 6 wurden ebenfalls mit Wildtyp-Mutante-Mischungen durchgeführt. Die Annealingtemperatur wurde nicht über 61°C erhöht, da dann die Primerbindung nicht mehr optimal stattfinden würde. Es wurden Mischungen von mutierter und nichtmutierter DNA in den Verhältnissen 1:100, 1:1000 und 1:10 000 getestet. Als Kontrolle wurden je 10 Millionen Kopien nichtmutierter und mutierter DNA amplifiziert. Die Blockerkonzentration betrug 0,8  $\mu$ M. Es wurden LNA-clamp-PCRs durchgeführt und die daraus erhaltenen PCR-Produkte wurden zur Schmelzkurvenauswertung in einer weiteren PCR unter Einsatz der Hybridisierungssonden reamplifiziert (Abbildung 4.15). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

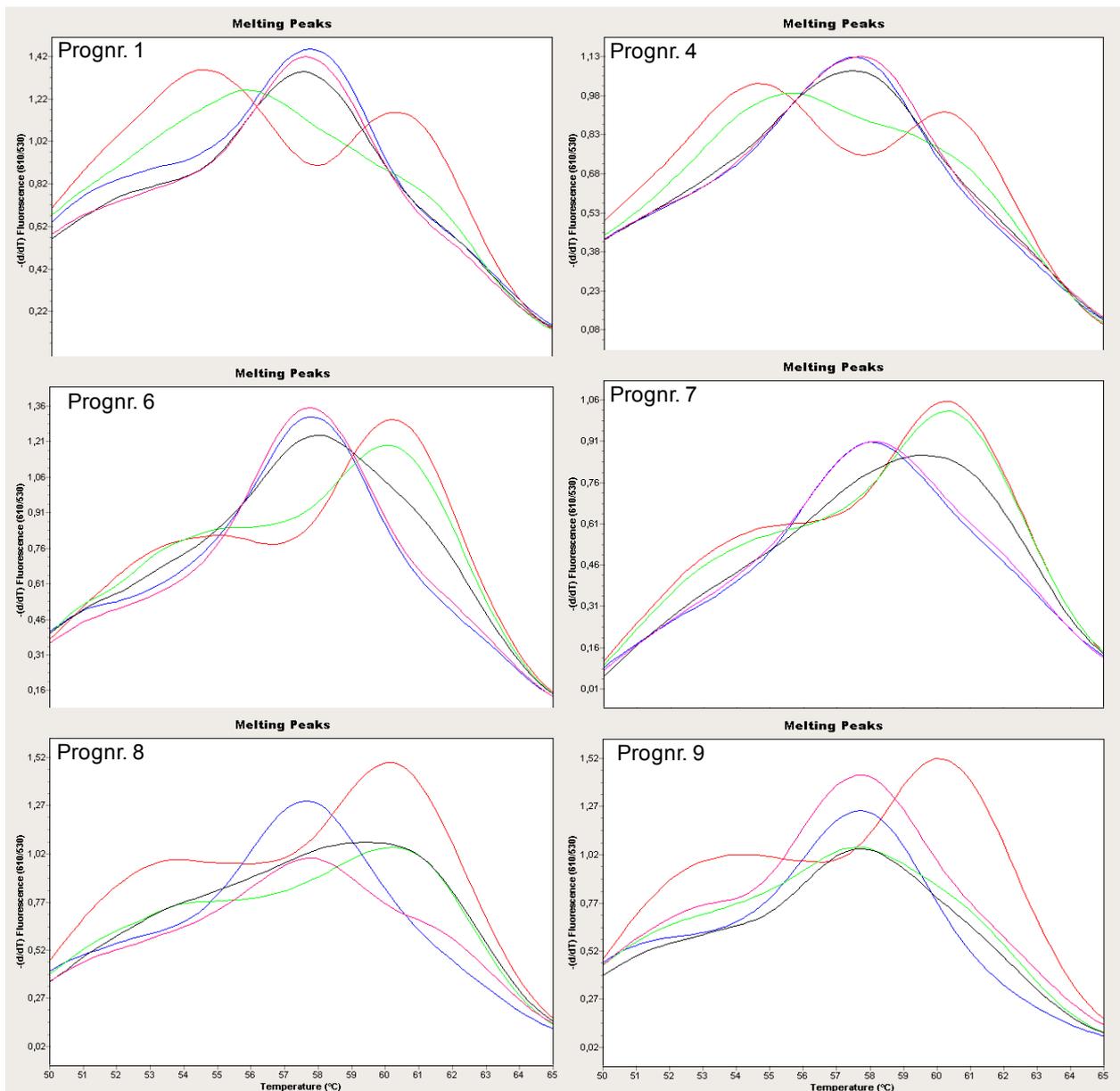


Abbildung 4.15: *BRAF*: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Einfluss des Temperaturprogramms auf das Detektionslimit

Gezeigt sind die Schmelzkurven der Mutante / Wildtypmischungen 1:100 (grün), 1:1000 (schwarz) und 1:10 000 (pink). Als Kontrollen wurden die reinen Plasmidsysteme für Wildtyp (blau) und Mutante Cd 600 GTG --> GAG (rot) analysiert.

Prognr. 1: 70°C / 56°C / 65°C;

Prognr. 4: 70°C / 60°C / 67°C

Prognr. 6: 71°C / 61°C / 70°C

Prognr. 7: 73°C / 61°C / 73°C

Prognr. 8: 74°C / 61°C / 74°C;

Prognr. 9: 75°C / 61°C / 75°C;

Mit den Programmen Nummer 6 und 7 wird ein Detektionslimit von 1:1000 erreicht. Bei Programm Nummer 6 ist die Verschiebung des Schmelztemperaturmaximums für die 1:1000 Mischung nur schwach ausgeprägt. Bei Programm Nummer 8 ist auch für die Mischung 1:10 000 ein zweites, kleineres Maximum im Bereich der Schmelztemperatur der Mutanten sichtbar. Das erzielte Detektionslimit beträgt 1:10 000. Mit Programm Nummer 9 findet keine ausreichende Anreicherung des mutierten Fragments statt.

Programmnummer	Blockerbindungstemperatur	Annealingtemperatur	Elongationstemperatur	Detektionslimit
1	70°C	56°C	65°C	1:100
4	70°C	60°C	67°C	1:100
6	71°C	61°C	70°C	1:1000 schwach
7	73°C	61°C	73°C	1:1000
8	74°C	61°C	74°C	1:10 000
9	75°C	61°C	75°C	< 1:100

Tabelle 4.7: *BRAF* LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Einfluss des Temperatur-Zeit-Profiles auf das Detektionslimit. Zusammenfassung der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalysen

Das beste Ergebnis mit einem Detektionslimit von 1:10 000 wurde mit der Elongationstemperatur von 74°C (Programm 8) erzielt. Bei 65°C und 67°C (Programme 1 und 4) wurde auch das mutierte Fragment geblockt (vergleiche CT-Werte Tabelle 4.6). Bei 70°C und 73°C (Programme 6 und 7) wird ein Detektionslimit von 1:1000 erreicht, die Verschiebung des Schmelztemperaturmaximums fällt bei 70°C nicht so deutlich aus wie bei 73°C. Bei einer Elongationstemperatur von 75°C (Programm 9) ist möglicherweise der Blocker nicht mehr ausreichend an das Wildtyp-Fragment gebunden und die Amplifikation wird weniger inhibiert.

Der Einfluss des Temperaturprofils auf das Detektionslimit ist größer als der der Blockerkonzentration. Die Elongationstemperatur ist dabei der entscheidende Faktor.

### **Bestimmung des Detektionslimits**

Die PCR-Produkte der LNA-clamp-PCR unter optimalen Bedingungen (Programm 8; 0,8 µM Blocker) wurden zur Bestimmung des Detektionslimits reamplifiziert (Abbildung 4.16 B).

Zur Überprüfung der Schmelzkurven wurden die PCR-Produkte sequenziert (Abbildung 4.16 C - G). Außerdem wurde der gesamte Versuch an den Plasmidmodellsystemen ohne den Einsatz von Blocker durchgeführt (Abbildung 4.16 A). Damit wurde gezeigt, dass die erzielten Detektionslimits auf den Einsatz von Blocker zurückzuführen sind. Dies wurde für alle Genfragmente gemacht und wird hier exemplarisch gezeigt.

Abbildung 4.16 A) zeigt die Schmelzkurven des mutierten Fragments, des Wildtyps und der Mischung 1:1000 ohne die Verwendung von Blocker in der LNA-clamp-PCR. Mutante und Wildtyp unterscheiden sich in ihren Schmelztemperaturmaxima, die Mischung 1:1000 (schwarz) entspricht in ihrer Schmelzkurve dem Wildtyp. Das mutierte Fragment ist darin nicht detektierbar. Die Sequenzierkurve der Mischung entspricht diesem Ergebnis, an Position der Punktmutation (schwarzer Pfeil) befindet sich nur die Wildtypbase T (Abbildung 4.16 E).

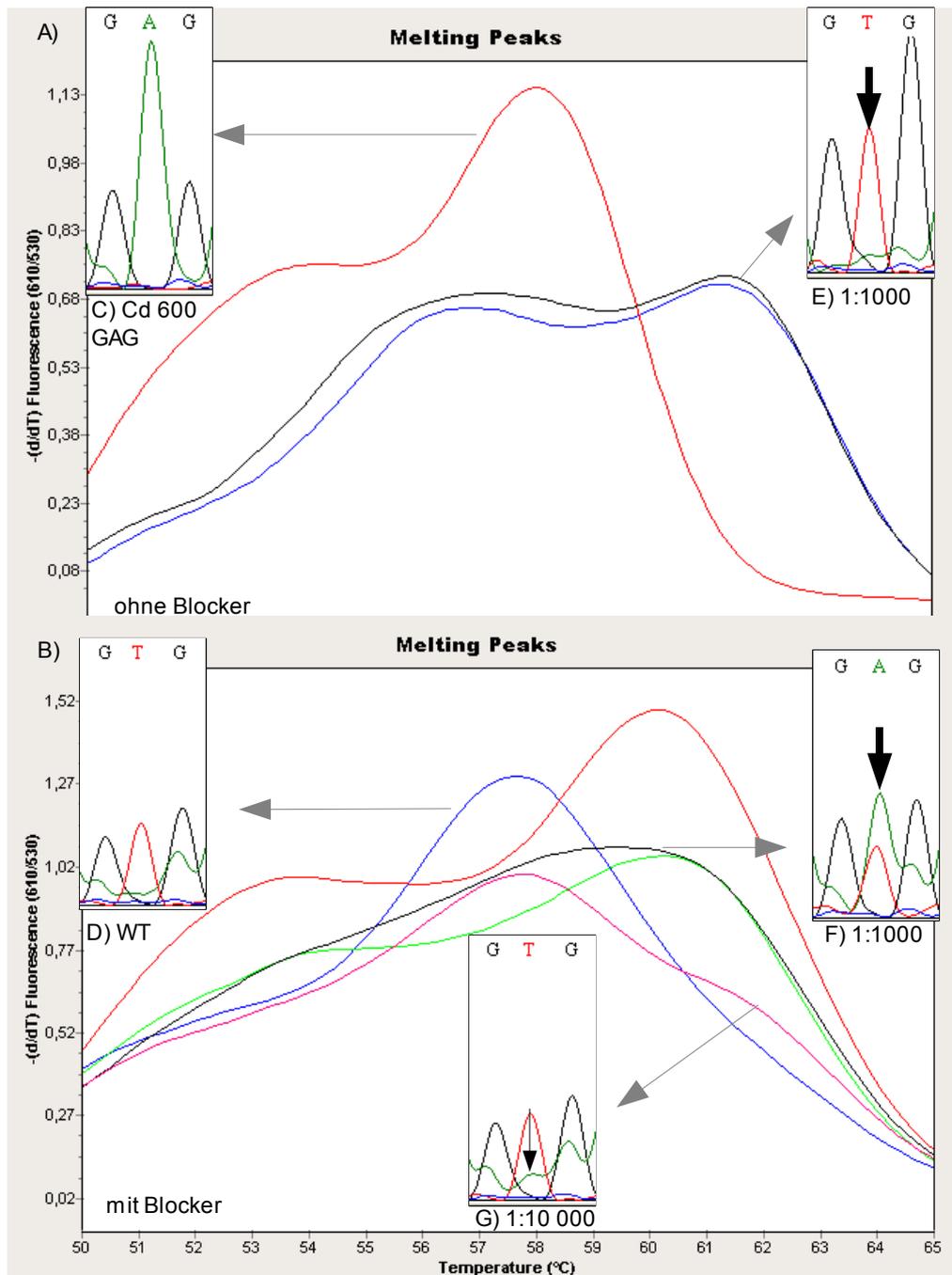


Abbildung 4.16: *BRAF*: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Das erzielte Detektionslimit beträgt 1:10 000.

A: Schmelzkurven ohne vorangegangene Anreicherung mit Blocker: Wildtyp-Fragment (blau) und Mutante Cd 600 GTG → GAG (rot) zeigen unterschiedliche Schmelztemperaturmaxima. Die Schmelzkurve der Mischung 1:1000 (schwarz) ist nicht von der des Wildtyp-Fragments unterscheidbar.

B: Schmelzkurven nach Anreicherung des mutierten Fragments durch Blockereinsatz: Die Schmelzkurve der 1:100 Mischung (grün) entspricht der der Mutanten (rot). Die Mischung 1:1000 (schwarz) zeigt ein Schmelztemperaturmaximum zwischen Wildtyp-Fragment und Mutante. Die Schmelzkurve 1:10 000 zeigt zwei Maxima, wobei das kleinere dem des mutierten Fragments entspricht.

C: Sequenzierkurve Mutante Cd 600 GTG → GAG

D: Sequenzierkurve Wildtyp-Fragment GTG nach Einsatz von Blocker

E: Sequenzierkurve Mischung 1:1000 ohne Einsatz von Blocker: an Position der Punktmutation (schwarzer Pfeil) ist nur die Wildtypbase T detektierbar.

F und G: Sequenzierkurven der Mischung 1:1000 bzw. 1:10 000 nach Einsatz von Blocker: an Position der Punktmutation (schwarzer Pfeil) ist die Wildtypbase T und die mutierte Base A detektierbar.

In Abbildung 4.16 B) sind die Schmelzkurven der unter Verwendung von Blocker erhaltenen PCR-Produkte dargestellt. Die Schmelzkurve der 1:100 (grün) Mischung entspricht der der Mutanten. Die Mischung 1:1000 (schwarz) zeigt ein Schmelztemperaturmaximum zwischen Wildtyp-Fragment und Mutante. Sie enthält beide Fragmente. Dies wird durch die Sequenzierkurve bestätigt (Abbildung 4.16 F). An Position der Punktmutation (schwarzer Pfeil) befindet sich sowohl die Wildtypbase T als auch die mutierte Base A. Auch die Sequenzierkurve für die Mischung 1:10 000 (pink) zeigt nach Anreicherung durch Blockereinsatz die Anwesenheit von mutiertem Fragment zu einem geringen Anteil (schwarzer Pfeil). Das erzielte Detektionslimit beträgt nach Analyse der Schmelzkurven und der Sequenzierkurven 1:10 000.

#### 4.4.3 LNA als Amplifikationsblocker bei *CTNNB1*

Für das Genfragment *CTNNB1* wurde der Blocker ebenfalls als Amplifikationsblocker eingesetzt. Es sollen 3 verschiedene Mutationen in 2 Codons detektiert werden. Für jedes Codon wurde jeweils ein Blocker entworfen, der Blocker b-cat LNA1 wurde zur Anreicherung von beiden Mutationen des Codons 41 (ACC --> GCC und ACC --> ATC) verwendet, der Blocker b-cat LNA2 sollte zur Anreicherung der Mutation in Codon 45 verwendet werden (Abbildung 4.17).

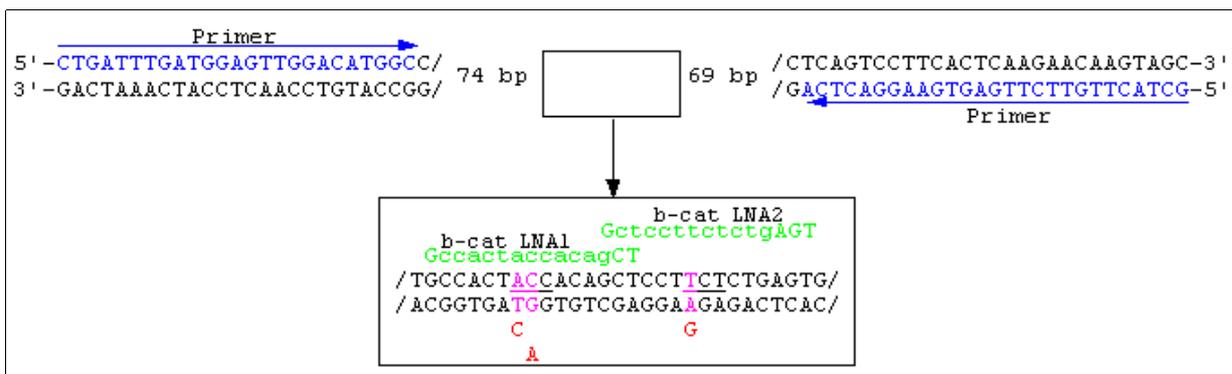


Abbildung 4.17: *CTNNB1*: LNA als Amplifikationsblocker: Positionen und Sequenzen der Blocker und Primer  
Dargestellt sind die beiden Stränge der Wildtypsequenz. Der Blocker (grün) bindet an die Wildtypsequenz und verhindert die Verlängerung durch die Polymerase. Durch die Punktmutation wird diese Bindung destabilisiert und die Amplifikation findet statt. Blocker b-cat LNA1 überspannt Codon 41 und dient zur Anreicherung der Mutationen Cd 41 ACC --> GCC bzw. ACC --> ATC. Der Blocker b-cat LNA2 wird zur Anreicherung der Mutation Codon 45 TCT --> CCT verwendet. Pink: Wildtypbasen an Position der Punktmutation; Rot: mutierte Basen im Gegenstrang; Kleinbuchstaben: LNA-Monomere; Blau: Sequenz der Primer; Grün: Blockersequenz; Unterstrichen: Codons 41 und 45

#### Optimierung der Bedingungen

Die LNA-clamp-PCR wurde mit SYBRGreen zur Bestimmung der Blockereffizienzen durchgeführt. Das erste getestete Temperaturprofil bestand aus drei Schritten: der Annealing- und Elongationsschritt wurde in einem zusammengefasst und bei 68°C durchgeführt, da die Primerschmelztemperaturen 65°C und 68°C betragen. Die Blockerbindung fand bei 74°C statt. Wildtyp-Fragment und mutierte Fragmente wurden jeweils in gleichen Mengen eingesetzt (100 Millionen Kopien). Die Blockerkonzentration betrug 0,8 µM.

Diese Bedingungen erwiesen sich für den Blocker, welcher Codon 41 überspannt (b-cat LNA1), als geeignet. Der Mittelwert der in drei Läufen bestimmten Blockereffizienz beträgt für beide Mutationen 10,8 (Tabelle 4.8).

	$\Delta$ CT Wildtyp-DNA	$\Delta$ CT mutierte DNA	Blockereffizienz $\Delta\Delta$ CT-Wert
Cd 41 ATC 1. Lauf	11,93	0,93	11
Cd 41 ATC 2. Lauf	11,1	0,79	10,3
Cd 41 ATC 3. Lauf	12,39	1,39	11
Mittelwert			10,8
Cd 41 GCC 1. Lauf	11,93	1,12	10,8
Cd 41 GCC 2. Lauf	11,1	0,25	10,9
Cd 41 GCC 3. Lauf	12,39	1,57	10,8
Mittelwert			10,8

Tabelle 4.8: *CTNNB1* Codon41: Bestimmung der Blockereffizienz in drei Wiederholungen

Für den Codon 45 überspannenden Blocker (b-cat LNA2) konnte mit diesen Bedingungen keine ausreichend hohe Blockereffizienz erzielt werden. Das mutierte Fragment wird, wie aus den CT-Werten zu entnehmen ist, ebenfalls relativ stark geblockt. Um die Inhibition des mutierten Fragments Cd45 CCT zu verringern, wurde die Blockerkonzentration von 0,8  $\mu$ M auf 0,3  $\mu$ M vermindert und das Temperaturprofil verändert. Die Schritte Primerbindung und Elongation wurden getrennt bei 64°C und 72°C durchgeführt (Tabelle 4.9).

	Blockerkonzentration [ $\mu$ M]	Temperatur-Profil	$\Delta$ CT Wildtyp-DNA	$\Delta$ CT mutierte DNA	Blockereffizienz $\Delta\Delta$ CT-Wert
1. Lauf	0,8	68°C	13,34	7,29	6,1
2. Lauf	0,3	68°C	13,39	6,97	6,4
3. Lauf	0,3	64°C / 72°C	13,39	6,95	6,4

Tabelle 4.9: *CTNNB1* Codon 45: Bestimmung der Blockereffizienz bei unterschiedlichen Parametern

Auch unter diesen Bedingungen konnte keine Verbesserung der Blockereffizienz für den Blocker b-cat LNA2 erzielt werden.

### **Bestimmung des Detektionslimits**

Die in den LNA-clamp-PCRs erhaltenen PCR-Produkte wurden in Anwesenheit von Hybridisierungssonden reamplifiziert. Im Anschluss daran wurde zur Bestimmung der erzielten Detektionslimits eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

#### **Detektionslimit für *CTNNB1* Codon 41 GGC**

In Abbildung 4.18 ist das Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse von Codon 41 GGC nach Reamplifikation der in Anwesenheit von Blocker hergestellten PCR-Produkte dargestellt.

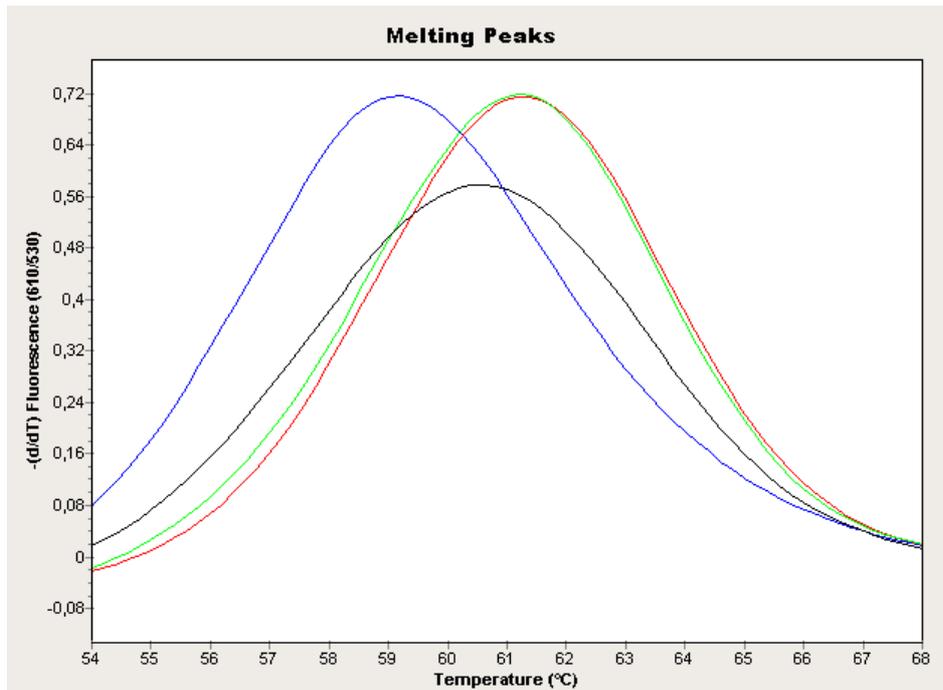


Abbildung 4.18: *CTNNB1*: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Schmelzkurven zur Bestimmung des Detektionslimits für Codon 41 ACC → GCC

Wildtyp-Fragment (blau) und Mutante (rot) zeigen unterschiedliche Schmelztemperaturmaxima. Die Mischung 1:100 (grün) hat das gleiche Temperaturmaximum wie die Mutante, der Wildtyp ist in dieser Mischung nicht mehr detektiert. Die Mischung 1:1000 (schwarz) hat ihr Maximum zwischen Wildtyp und Mutante, enthält also beide Fragmente zu detektierbaren Anteilen. Das erzielte Detektionslimit beträgt 1:1000.

Das Detektionslimit bei den verwendeten Parametern beträgt 1:1000, die Schmelzkurve dieser Mischung (schwarz) zeigt eine deutliche Verschiebung des Maximums in Richtung mutiertes Fragment (rot). Mittels Sequenzierung konnte das Vorhandensein der Wildtyp und der mutierten Base in der 1:1000 Mischung bestätigt werden.

#### Detektionslimit für *CTNNB1* Codon 41 ATC

Die Schmelzkurvenanalyse für die Mutation Codon 41 ATC zeigt für das Wildtyp-Fragment und das mutierte Fragment das gleiche Schmelztemperaturmaximum. Das Detektionslimit ist nicht mittels Schmelzkurvenanalyse bestimmbar. Es muss auf die Sequenzierung zurückgegriffen werden. Für die Detektion mittels Schmelzkurven müsste eine neue Akzeptorsonde entworfen werden.

Die Sequenzierkurven (Abbildung 4.19) zeigen ein Detektionslimit von mindestens 1:1000. In der Sequenzierkurve der Mischung 1:1000 ist der Peak der mutierten Base T höher als der Peak der Wildtypbase C (schwarzer Pfeil). Eine Mischung mit einem geringeren Anteil Mutante wurde nicht untersucht.

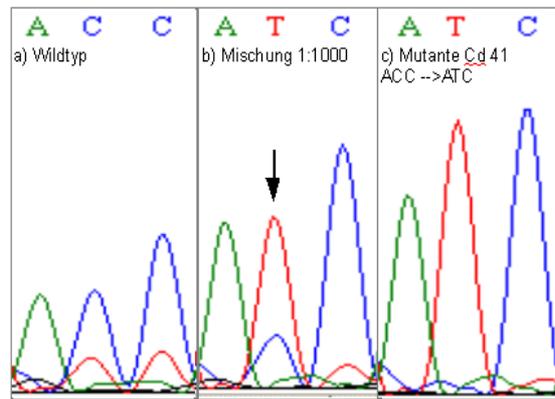


Abbildung 4.19: *CTNNB1*: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Sequenzierkurven Codon 41 Wildtyp (a), Mutante ACC  $\rightarrow$  ATC (c) und Mischung Mutante / Wildtyp 1:1000 (b) nach LNA-clamp-PCR. In der Mischung ist an Position der Punktmutation (schwarzer Pfeil) die mutierte Base T zu detektieren. Das Detektionslimit beträgt mindestens 1:1000.

### Detektionslimit für *CTNNB1* Codon 45 CCT

In Abbildung 4.20 ist das Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse von Codon 45 CCT nach Reamplifikation der in Anwesenheit von Blocker hergestellten PCR-Produkte dargestellt.

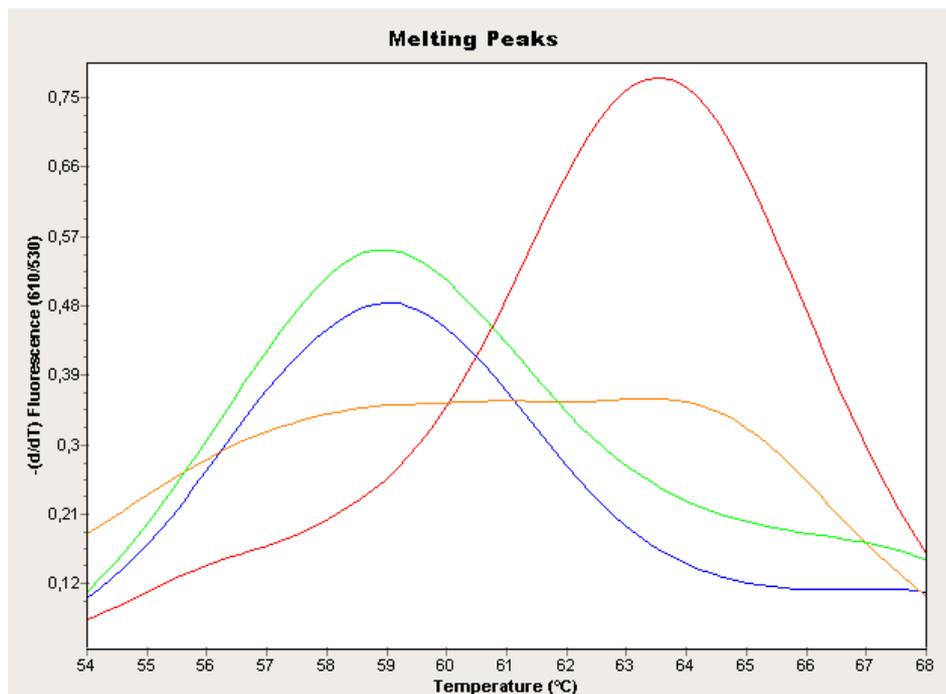


Abbildung 4.20: *CTNNB1*: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Schmelzkurven zur Bestimmung des Detektionslimits für Codon 45 TCT  $\rightarrow$  CCT

Wildtyp-Fragment (blau) und Mutante (rot) zeigen unterschiedliche Schmelztemperaturmaxima. Die Mischung 1:10 (orange) hat ihr Maximum zwischen Wildtyp und Mutante, enthält also beide Fragmente zu detektierbaren Anteilen. Die Mischung 1:100 (grün) hat das gleiche Temperaturmaximum wie der Wildtyp, die Anreicherung des mutierten Fragments in einen detektierbaren Bereich ist nicht erfolgt. Das erzielte Detektionslimit beträgt 1:10.

Für Codon 45 CCT konnte mit den Bedingungen, die für Codon 41 geeignet sind, nur ein Detektionslimit von 1:10 erzielt werden. Nur die Schmelzkurve der Mischung 1:10 (orange) zeigt eine Verschiebung des Schmelztemperaturmaximums in Richtung Mutante (rot). Das Detektionslimit von 1:10 wurde anhand der Sequenzierkurven bestätigt.

#### 4.4.4 LNA als Amplifikationsblocker und Detektionssonde bei *K-ras*

Für das Genfragment *K-ras* wurde ebenfalls die LNA-clamp-PCR mit LNA als Amplifikationsblocker etabliert. Zusätzlich trug der Blocker an seinem 5'-Ende eine Rox-Markierung und diente somit gleichzeitig als Akzeptorsonde (Abbildung 4.10, Variante C). Ziel war es, im gleichen Ansatz die LNA-clamp-PCR und die Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Eine Übersicht über die Lage von Blocker und Primern und deren Sequenzen befindet sich in Abbildung 4.21.

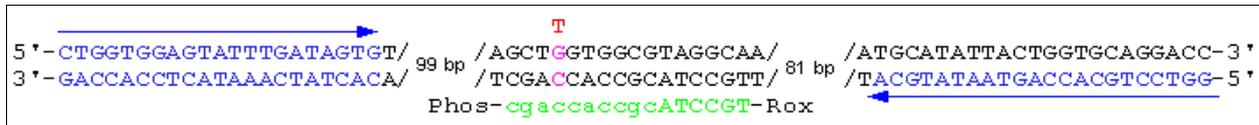


Abbildung 4.21: *K-ras*: LNA als Amplifikationsblocker: Positionen und Sequenzen des Blockers und der Primer Dargestellt sind die beiden Stränge der Wildtypsequenz. Der Blocker bindet an die Wildtypsequenz und verhindert die Verlängerung durch die Polymerase. Durch die Punktmutation wird diese Bindung destabilisiert und die Amplifikation findet statt. Zusätzlich trägt der Blocker am 5'-Ende einen Rox-Farbstoff und kann somit als Akzeptorsonde bei der Schmelzkurvenanalyse dienen. Pink: Wildtypbasen an Position der Punktmutation; Rot: mutierte Base; Kleinbuchstaben: LNA-Monomere; Grün: Blockersequenz; Blau: Primersequenz

#### Optimierung der Bedingungen

In einer „realtime-SYBRGreen“-PCR wurde der Einfluss der Blockerkonzentrationen 0, 250 und 500 nM auf die Amplifikation des Wildtyp-Fragments und des in Codon 12 GGT --> TGT mutierten Fragments untersucht. Die Reaktionen wurden mit 0,083 nM Wildtypplasmid (entspricht 1 Milliarde Kopien) und 0,083 nM und 0,83 pM mutiertem Plasmid durchgeführt. Die Elongationstemperatur betrug 66°C. Die PCR-Produkte wurden anschließend per Gelelektrophorese analysiert (Abbildung 4.22) und die Blockereffizienzen wurden bestimmt (Tabelle 4.10).

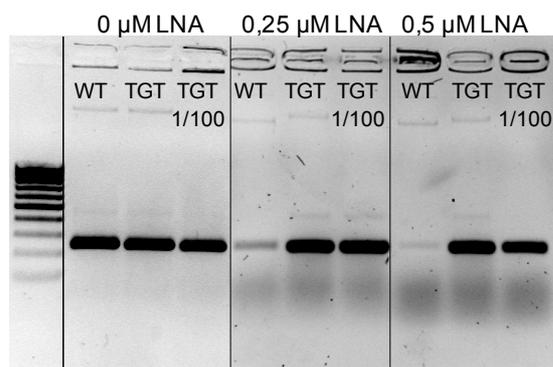


Abbildung 4.22: *K-ras*: LNA als Amplifikationsblocker: Einfluss der Blockerkonzentration Das Wildtypfragment (WT) wird durch den Blocker inhibiert. 0,5 µM Blocker bewirkt eine stärkere Unterdrückung als 0,25 µM. Die Mutante (TGT) zeigt bei dem Einsatz von 1/100 der Wildtypmenge eine geringe Inhibition.

Die Amplifikation des Wildtyps wird durch den LNA-Blocker deutlich inhibiert, während die Amplifikation der gleichen Menge des mutierten Fragments nicht sichtbar beeinflusst wird. Bei dem Einsatz von 0,5 µM Blocker fällt die Unterdrückung des Wildtyps stärker aus. Hier ist auch eine geringe Inhibition der um 1/100 kleineren Menge des mutierten Fragments zu beobachten. Eine völlige Unterdrückung des Wildtyps wurde mit den verwendeten Blockerkonzentrationen nicht erreicht.

	CT-Wert Wildtyp-DNA	$\Delta$ CT Wildtyp-DNA	CT-Wert mutierte DNA	$\Delta$ CT mutierte DNA	Blockereffizienz $\Delta\Delta$ CT-Wert
Ohne Blocker	13,6		12,9		
0,25 $\mu$ M Blocker	27,4	13,8	15,5	2,6	11,2
0,5 $\mu$ M Blocker	31,1	17,5	16,7	3,8	13,7

Tabelle 4.10: *K-ras*: Blockereffizienz bei 0,25  $\mu$ M und 0,5  $\mu$ M Blockerkonzentration

Die Blockereffizienz bei 0,5  $\mu$ M Blocker war höher als bei 0,25  $\mu$ M Blocker. Dies stimmt mit der Gelauswertung überein. Die Verdoppelung der Blockermenge brachte allerdings keine Verdoppelung der Effizienz. Die Erhöhung der Effizienz war nur gering. Die Blockerkonzentration allein ist somit nicht der entscheidende Parameter.

### **Bestimmung des Detektionslimits bei verschiedenen Elongationstemperaturen**

Es sollte untersucht werden, ob durch die Variation der Elongationstemperatur eine Veränderung des Detektionslimits erzielt werden kann. Dazu wurden die in der LNA-clamp-PCR gewonnenen PCR-Produkte aus Wildtyp-Fragment, aus dem in Codon 12 GGT  $\rightarrow$  TGT mutierten Fragment und aus Mischungen der beiden in einer zweiten PCR reamplifiziert. Die LNA-clamp-PCRs wurden bei Elongationstemperaturen von 70°C, 68°C, 66°C und 64°C durchgeführt. Die Reamplifikation der PCR-Produkte ergab die in Abbildung 4.23 dargestellten Schmelzkurven.

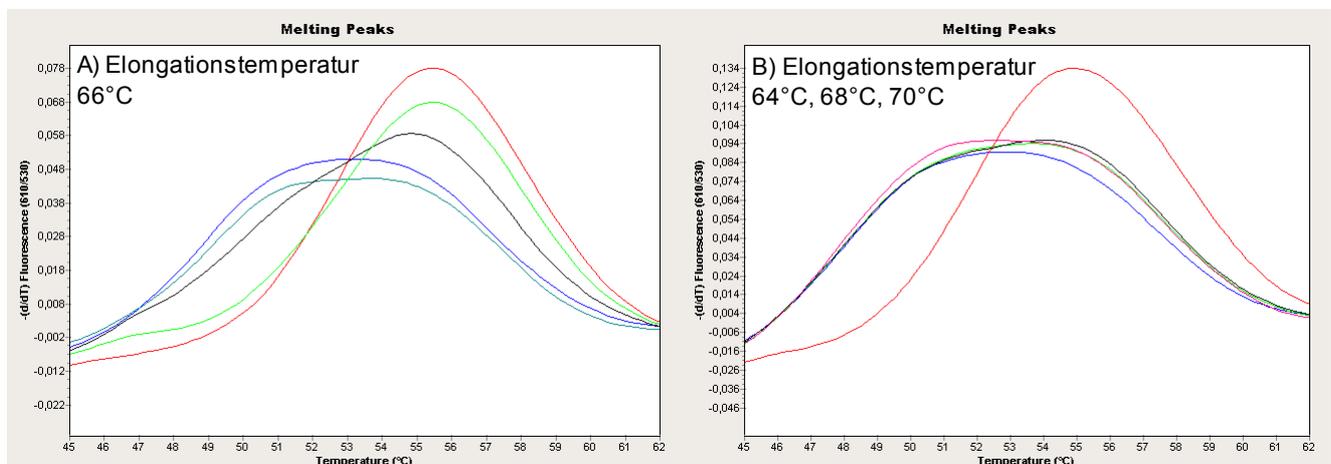


Abbildung 4.23: *K-ras*: LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker: Schmelzkurven zur Bestimmung des Detektionslimits für Codon 12 GGT  $\rightarrow$  TGT bei verschiedenen Elongationstemperaturen  
Wildtyp-Fragment (blau) und Mutante (rot) zeigen unterschiedliche Schmelztemperaturmaxima.

A) Die Mischung 1:100 (grün) hat das gleiche Temperaturmaximum wie die Mutante. Der Wildtyp ist in dieser Mischung nicht mehr detektierbar. Die Mischung 1:1000 (schwarz) hat ihr Maximum zwischen Wildtyp und Mutante, enthält also beide Fragmente zu detektierbaren Anteilen. In der 1:10 000 Mischung (türkis) ist kein mutiertes Fragment detektierbar. Das erzielte Detektionslimit beträgt 1:1000.

B) In den 1:1000 Mischungen bei den Elongationstemperaturen 68°C (schwarz) und 70°C (grün) ist ebenfalls das mutierte Fragment detektierbar. Bei der Elongationstemperatur 64°C (pink) zeigt die Mischung 1:1000 das gleiche Maximum wie die Wildtypschmelzkurve.

Mit den Elongationstemperaturen 66°C, 68°C und 70°C wird jeweils ein Detektionslimit von 1:1000 erzielt. Die Kurven der 1:1000 Mischung zeigen eine Verschiebung des Schmelzpunktmaximums in Richtung Mutante, wobei die Verschiebung bei 66°C am deutlichsten ausfällt. Eine Verringerung auf 64°C zeigt eine Verschlechterung des Detektionslimits.

Zur Überprüfung der Schmelzkurvenanalyse wurden die PCR-Produkte aus der LNA-clamp-PCR bei 66°C Elongationstemperatur sequenziert. Die Sequenzierkurve für die Mischung 1:1000 zeigt an Position der Punktmutation die beiden Peaks für die Wildtypbase G und die mutierte Base T übereinander liegend (Daten sind nicht gezeigt).

#### 4.4.5 Verwendung von Polymerase ohne Exonukleasefunktion

Die LNA-clamp-PCR-Systeme wurden mit einer Polymerase mit 5'-3'-Exonukleasefunktion (Exo<sup>+</sup>) (FastStart Taq, Roche Diagnostics) etabliert. LNA-Oligonukleotide sind laut Dominguez und Kolodney (2005) nicht gegen den Abbau durch die 5'-3'-Exonukleasefunktion der Polymerase resistent. Um die Auswirkung der 5'-3'-Exonukleasefunktion auf die Blockereffizienz zu überprüfen, wurden Experimente mit der KleinTaq (Bioron, Ludwigshafen) ohne Exonukleasefunktion (Exo<sup>-</sup>) an dem Plasmidmodellsystem *BRAF* im „realtime“-PCR-Format mit SYBRGreen durchgeführt. Es wurde die Blockerkonzentration von 0,4 µM eingesetzt. Außerdem wurde noch eine um das 20fach niedrigere Blockerkonzentration von 0,05 µM getestet. Die damit bei verschiedenen Temperaturprofilen erhaltenen Blockereffizienzen sind in Tabelle 4.11 dargestellt. Die Stufe für die Blockerbindung wurde mit 70°C konstant gehalten.

Temperatur-Profil	Blockerkonzentration 0,05 µM			Blockerkonzentration 0,4 µM		
	Δ CT Wildtyp	Δ CT Mutante	Blockereffizienz	Δ CT Wildtyp	Δ CT Mutante	Blockereffizienz
56°C / 68°C	16,4	7,1	9,4	19,1	8,3	10,8
59°C / 71°C	15,6	3,0	12,6	18,0	6,9	11,1
61°C / 74°C	14,9	1,0	13,9	15,5	3,0	12,5
62°C / 75°C	14,8	0,8	14,0	18,0	3,9	14,1

Tabelle 4.11: Verwendung von Polymerase ohne Exonukleasefunktion (Exo<sup>-</sup>)(KleinTaq): Blockereffizienzen bei verschiedenen Blockerkonzentrationen und Temperatur-Profilen

Die Blockereffizienz ist weniger von der Konzentration des Blockers (Δ Blockereffizienz 0,05 µM – 0,4 µM: 0,1 bis 1,5) als vom Temperatur-Profil (Δ Blockereffizienz: 4,6 bzw. 3,3) abhängig. Der Δ CT-Wert für Wildtyp und Mutante nimmt mit steigender Temperatur ab, für die Mutante jedoch in größerem Maße als für den Wildtyp, woraus sich die steigende Blockereffizienz ergibt. Eine höhere Blockerkonzentration bewirkt bei gleichen Temperaturen eine stärkere Unterdrückung der Mutante und des Wildtyps bei im Ergebnis annähernd gleich bleibender Blockereffizienz. Die Blockereffizienz ist nicht von der Blockerkonzentration im getesteten Bereich (0,05 µM bis 0,8 µM) abhängig.

In Tabelle 4.12 werden die erhaltenen Δ CT-Werte und die Blockereffizienzen von Exo<sup>+</sup> - und Exo<sup>-</sup>-Polymerase miteinander verglichen. Die Läufe wurden bei 70°C bzw. 72°C Elongationstemperatur durchgeführt.

Polymerase	Blockerkonzentration	$\Delta$ CT Wildtyp	$\Delta$ CT Mutante	Blockereffizienz
Exo <sup>+</sup>	0,8 $\mu$ M	12,3	1,4	10,8
Exo <sup>-</sup>	0,8 $\mu$ M	18,9	9,8	9,1
Exo <sup>-</sup>	0,4 $\mu$ M	17,1	6,2	10,9

Tabelle 4.12: Vergleich Polymerase mit und ohne Exonukleasefunktion

Ein deutlicher Unterschied zwischen Exo<sup>+</sup>- und Exo<sup>-</sup>-Polymerasen ergibt sich für die  $\Delta$  CT-Werte für das Wildtyp-Fragment bzw. das mutierte Fragment. Bei der Verwendung von Exo<sup>-</sup> sind sie bei gleichen Blockerkonzentration höher als bei Exo<sup>+</sup>. Da dies für Wildtyp und Mutante in etwa gleichem Maße gilt, ergibt sich für die Blockereffizienz kein nennenswerter Unterschied. Die starke Inhibition der Mutante bei Verwendung von Exo<sup>-</sup>-Polymerase führt jedoch bei einer niedrigen Kopienzahl zu einer Abnahme der Sensitivität des Nachweises. Deshalb sollte mit Exo<sup>-</sup>-Polymerase eine niedrigere Blockerkonzentration verwendet werden (vergleiche Tabelle 4.11).

In der LNA-clamp-PCR können Polymerasen sowohl mit als auch ohne Exonukleasefunktion verwendet werden.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein Anreicherungsverfahren für Punktmutationen enthaltende Sequenzen zu entwickeln und somit deren Nachweis zu ermöglichen, auch wenn sie in einem hohen Hintergrund nichtmutierter Sequenzen vorliegen. Dies ist für die Diagnose von Darmkrebs und dessen Vorstufen anhand der Analyse von DNA-Markern in Stuhlproben von großer Bedeutung. In diesen Proben liegt die DNA aus gesunden Zellen gegenüber der aus Krebszellen oder Krebsvorläuferzellen im hohen Überschuss vor. In dieser Arbeit konnte die LNA-clamp-PCR als Methode zur Anreicherung von mutierten Fragmenten gegenüber Wildtyp-Fragmenten für drei verschiedene Gene etabliert werden.

### 5.1 Verwendung der Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung des Detektionslimits

Die Detektion der Punktmutationen erfolgte in dieser Arbeit über die Schmelzkurvenanalyse von Hybridisierungssonden. Dieses Verfahren wurde zur Auswertung der erzielten Ergebnisse der Anreicherungsverfahrens LNA-clamp-PCR und zur Bestimmung des relativen Detektionslimits in Mischungen aus Wildtyp-Fragment und mutiertem Fragment verwendet. Das Nachweissystem wurde zu diesem Zweck für die untersuchten Gene und die entsprechenden mutierten Sequenzen etabliert. Die Schmelzkurvenanalyse wurde in dieser Arbeit als zweite PCR mit den Produkten aus der LNA-clamp-PCR durchgeführt. Sie stellt ein schnelles und kostengünstiges Verfahren zur Überprüfung der stattgefundenen Anreicherung des mutierten Fragments dar, die mit der vorhandenen Laborausstattung durchgeführt werden konnte.

Die Schmelzkurvenanalyse im gleichen Ansatz wie die LNA-clamp-PCR wurde am Plasmidmodellsystem *K-ras* getestet. Dafür wurde ein Blocker verwendet, der durch seine Rox-Markierung gleichzeitig als Akzeptorsonde diente. Ein vergleichbarer Assayaufbau wurde von Luo und Kollegen (2006) mit PNA als Amplifikationsblocker und Donorsonde für das Gen *K-ras* verwendet. Die in dieser Arbeit erhaltene Schmelztemperatur für das Wildtyp-Fragment lag unter der des mutierten Fragments, obwohl die Sonden der Wildtypsequenz entsprechen und deshalb hier erst bei höheren Temperaturen abschmelzen sollten. Da die Ursache hierfür nicht geklärt werden konnte, wurde für die weitere Assayetablierung auf die separate Schmelzkurvenanalyse zurückgegriffen.

Die Anreicherung mit LNA-Blocker und die Detektion über die Schmelzkurvenanalyse im gleichen Ansatz ist möglich, erfordert jedoch weitere Optimierungsschritte. Dabei kann zusätzlich zu dem LNA-haltigen Blocker ein separates fluoreszenzmarkiertes Oligonukletidpaar als Sondensystem eingesetzt werden. Der Blocker und die Sonden müssen dafür an dem gleichen Strang binden, da sie sonst zueinander komplementär sind. Außerdem muss die Sonde das mutierte Fragment detektieren, da das Wildtyp-Fragment durch den Blocker gebunden ist und somit keine Sondenhybridisierung stattfinden kann. Dieser Assayaufbau wurde von Chen und Kollegen (2004)

mit PNA-Blocker und von Senescau und Kollegen (2005) mit LNA-Blocker veröffentlicht.

In dieser Arbeit wurde die Schmelzkurvenanalyse anschließend an eine zweite PCR, in der das Produkt aus der LNA-clamp-PCR reamplifiziert wurde, durchgeführt. Dazu wurden für die drei Genfragmente *BRAF*, *CTNNB1* und *K-ras* „realtime“-PCRs mit Hybridisierungs sonden etabliert. Damit konnten die Wildtypsequenzen und die entsprechenden Punktmutationen mit einem Sondenpaar je Genfragment über den Schmelztemperaturunterschied nachgewiesen werden (Tabelle 4.2). Für *BRAF* handelt es sich um eine Punktmutation, für *CTNNB1* um drei Punktmutationen, die sich in einem Bereich von 13 Basenpaaren befinden und bei *K-ras* können vier Punktmutationen und der Wildtyp voneinander unterschieden werden.

Für das in diesem Projekt zu entwickelnde Nachweissystem für Darmkrebs wird als Detektionsplattform ein DNA-Chip angestrebt. Dieser hat den Vorteil der besseren Automatisierbarkeit der Probenauswertung, während die Schmelzkurvenauswertung visuell erfolgen muss. Zudem erlaubt ein Chip die gleichzeitige Auswertung mehrerer Genfragmente und der dazugehörenden Punktmutationen.

## 5.2 Auswahl eines geeigneten Verfahrens zur Anreicherung von Punktmutationen

In dieser Arbeit sollte ein schnelles und kostengünstiges Verfahren mit einer möglichst geringen Fehleranfälligkeit etabliert werden. Zur Überprüfung auf ihre Anwendbarkeit wurden die Allelspezifische PCR, die Oligonukleotidligation und die clamp-PCR ausgewählt. Die Allelspezifische PCR und die clamp-PCR erfordern nur wenige Arbeitsschritte, die Oligonukleotidligation wird als sehr spezifisch beschrieben. Alle drei Verfahren werden als erfolgreich in Stuhl anwendbar beschrieben (Tabelle 5.4).

Bei dem Vergleich der drei Verfahren stellte sich die clamp-PCR als am geeignetsten heraus und wurde für die Analyse der drei Genfragmente *BRAF*, *CTNNB1* und *K-ras* weiterentwickelt. Die Oligonukleotidligation erfordert viele Arbeitsschritte und ist nicht für die Automatisierung geeignet. Die Allelspezifische PCR führte durch die Verlängerung von mutationsspezifischen Primern auf dem Wildtyp-Fragment trotz Basenfehlpaarung zum Einbau der Mutation und somit zu falsch positiven Ergebnissen. Dies wurde auch schon von Jen und Kollegen (1998) und Oldenburg und Kollegen (2008) beschrieben. Das Detektionslimit wird von Jarry und Kollegen (2004) mit 1:100 angegeben, was für eine Anwendung an Stuhlproben zu gering wäre und noch gesteigert werden müsste.

## 5.3 Clamp-PCR

Die clamp-PCR ist ein einfach anzuwendendes Verfahren. Die Anreicherung der mutierten Sequenz erfolgt in der PCR aus genomischer DNA. Eine Vor- oder Nachbehandlung ist nicht erforderlich. Somit ist die Fehleranfälligkeit und die Gefahr von Kontaminationen gering. Die Methode ist im Gegensatz zur Allelspezifischen PCR und zur Oligonukleotidligation nicht von der Spezifität einer

Enzymreaktion abhängig. Die Verwendung von Blockern in der PCR zur spezifischen Inhibition einer Sequenz hat den Vorteil, dass eine Anreicherung der mutierten Sequenz ohne Erzeugung falsch positiver Produkte erfolgt. Zudem überspannt ein Blocker mehrere potentiell mutierte Positionen und kann somit in einer PCR zur gleichzeitigen Anreicherung von verschiedenen Mutationen dienen.

Der Einsatz von DNA-Oligomeren als Blocker wurde von Seyama und Kollegen beschrieben (1992). Dabei wurde ein 18mer in einer relativ hohen Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  eingesetzt und ein relatives Detektionslimit von 1:1000 beschrieben. Die Diskriminierung von DNA-Oligomeren, die auf der geringeren Schmelztemperatur von Sequenzen mit Basenfehlpaarung beruht, ist jedoch nur schwach. Eine viel stärkere Diskriminierung aufgrund größerer Destabilisierung der Bindung durch eine Basenfehlpaarung ist mit PNA zu erzielen. Dabei kann ein kürzeres Oligonukleotid verwendet und somit eine höhere Sequenzspezifität erzielt werden. Erstmals wurde die Verwendung 1993 von Orum und Kollegen beschrieben. Sie zeigten die Verwendbarkeit als Blocker an der Primerbindungsstelle und als Amplifikationsblocker. In Stuhlproben wurde PNA als Primerblocker von Prix und Kollegen (2002) verwendet. Die Auswertung erfolgte auf einem DNA-Chip. Dabei wurde ein Detektionslimit von 1:1000 für *K-ras* beschrieben. Chen und Kollegen (2004) und Luo und Kollegen (2006) verwendeten PNA als Amplifikationsblocker für das Gen *K-ras* im „realtime“-PCR-Format mit einem beschriebenen Detektionslimit von bis zu 1:3000 bzw. 1:10 000. Das höchste Detektionslimit von 1:20 000 postulierten Gilje und Kollegen (2008) unter Verwendung von PNA als Amplifikationsblocker. Die Erhöhung des Detektionslimits wurde hier auf den Einsatz von HighFidelity-DNA-Polymerase gegenüber Taq-Polymerase zurückgeführt.

In dieser Arbeit wurden durch die Verwendung von Blockern Detektionslimits von 1:1000 für die Genfragmente *K-ras* und *CTNNB1* und von 1:10 000 für *BRAF* erzielt. Als Blockeroligonukleotid wurde das Nukleotidanalogen LNA eingesetzt.

### 5.3.1 Verwendung von LNA als Blocker

LNA hat in Hinblick auf die Affinität zu DNA und auf die Basenfehlpaarungsdiskriminierung ähnliche Eigenschaften wie PNA. Sie bindet mit hoher thermischer Stabilität an komplementäre DNA, was sich in einer hohen Schmelztemperatur widerspiegelt. Die Temperaturdifferenz, die durch eine einzelne Basenfehlpaarung erzeugt wird, ist viel höher als bei einer korrespondierenden DNA-DNA-Duplex. Dadurch wird eine bessere Diskriminierung erreicht. Zudem ist die Schmelztemperatur von kurzen LNA-Oligomeren im Vergleich zu DNA-Oligomeren relativ hoch. Kurze Oligonukleotide diskriminieren besser zwischen komplementärer Sequenz und Sequenz mit Basenfehlpaarung (Mouritzen et al, 2003). Außerdem ist LNA von verschiedenen Anbietern erhältlich und weitaus kostengünstiger als PNA. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf die Verwendung von LNA-Oligonukleotiden zurückgegriffen.

Arbeiten, in denen LNA als Blocker verwendet wurde, sind bisher nur selten veröffentlicht worden. Erstmals 2005 berichteten Dominguez und Kolodney, dass sie für das Gen *BRAF* Mutation Codon 600 TGT --> GAG mit LNA als Amplifikationsblocker ein Detektionslimit von 1:100 erzielt hatten. Die

Detektion erfolgte mittels Gelelektrophorese und Sequenzierung. Außerdem wurde die Verwendung von LNA als Amplifikationsblocker zur Punktmutationsdetektion von Senescau und Kollegen (2005) veröffentlicht. Hier erfolgte die Bestimmung des Detektionslimits über Schmelzkurvenanalyse und erreichte 1:1600. Die Verwendung von LNA als Primerblocker ebenfalls an dem Gen *BRAF* wurde von Oldenburg und Kollegen (2008) beschrieben. Dabei wurde die clamp-PCR mit der Allelspezifischen PCR kombiniert. In einer ersten PCR wurde unter Verwendung des Primerblockers das mutierte Fragment angereichert. Die zweite PCR erfolgte dann mit Primerblocker und allelspezifischem Primer. Es wurden zwei PCRs durchgeführt, um die Entstehung von falsch positiven PCR-Produkten durch die Verlängerung des die Mutation tragenden allelspezifischen Primers zu verhindern. Das erzielte Detektionslimit wurde als hoch beschrieben.

Die in der Literatur beschriebenen Detektionslimits unter Verwendung von LNA konnten in dieser Arbeit mit 1:1000 bis 1:10 000 ebenfalls erreicht bzw. übertroffen werden. Für drei Genfragmente wurde die LNA-clamp-PCR mit LNA als Amplifikationsblocker etabliert, für ein Genfragment (*BRAF*) die LNA-clamp-PCR mit LNA als Primerblocker.

## 5.4 Optimierung der LNA-clamp-PCR

Die erfolgreiche Anreicherung des mutierten Fragments mittels LNA-clamp-PCR hängt von den verwendeten Parametern ab. Optimal wäre die vollständige Blockierung des Wildtyps. Diese Reaktion steht aber in Konkurrenz mit der möglichst ungehinderten Amplifikation der mutierten DNA. Variable Parameter sind der Blocker selbst und dessen Konzentration und die PCR-Parameter, in erster Linie das Temperatur-Zeit-Profil. Im Folgenden werden die Einflüsse des Blockers und der PCR-Parameter, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurden, diskutiert.

### 5.4.1 Der Entwurf des Blockers

Der Blocker sollte zwischen Wildtypsequenz und Mutante diskriminieren. Diese Diskriminierung findet über die thermische Stabilität der Bindung und deren Destabilisierung durch eine Basenfehlpaarung statt. Darauf haben der Anteil der LNA-Monomere (Singh und Wengel, 1998), die Positionen der LNA-Monomere innerhalb des Blockers, die Position der Basenfehlpaarung innerhalb des Blockers (You et al., 2006) und die Länge des Blockers (Mouritzen et al., 2003; You et al., 2006) einen Einfluss. In Tabelle 5.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Blocker mit entsprechenden Parametern und die damit erzielten Detektionslimits dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Länge in bp	LNA-Monomere	Schmelztemperatur in °C	Blockerfunktion	Erzieltes Detektionslimit
BRAF-LNA1	aGCtaCaGT <u>G</u> aaa	13	6	64	Primerblocker	1:100
BRAF-LNA2	aGATTTCA <u>CT</u> GTAGc	15	13	86	Amplifikationsblocker	1:10 000
b-cat-LNA1	gcCACTA <u>CC</u> CACAGct	15	11	88	Amplifikationsblocker	1:1000
b-cat-LNA2	gcTCCT <u>TCT</u> CTGagt	15	10	86	Amplifikationsblocker	1:10
K-ras-LNA Rox1	tgccataCGCCAC <u>C</u> AGc	16	9	88	Amplifikationsblocker	1:1000

Tabelle 5.1: Verwendete Blocker, Länge, LNA-Monomer-Anteil, Schmelztemperatur nach TmPredict (exiqon.com) und damit erzieltes Detektionslimit, Großbuchstaben: LNA-Monomer; fett unterstrichen: mutierte Base

Reine LNA-Oligomere führen laut Singh und Wengel (1998) gegenüber LNA-DNA-Hybridmolekülen nicht zu einer linearen Erhöhung der Schmelztemperatur, da LNA-Monomere wahrscheinlich einen stabilisierenden Einfluss auf die Konformation benachbarter Nukleotide haben. Bei dem Blocker BRAF-LNA1 wurde ein LNA-DNA-Hybridmolekül eingesetzt. Gleichzeitig wurde die Empfehlung von You und Kollegen (2006) für eine gute Basenfehlpaarungsdiskriminierung berücksichtigt, wonach mindestens ein Triplet von Basen mit der mutierten Base in der Mitte durch LNAs ersetzt werden sollte. Dieser Blocker hat laut TmPredict (Exiqon, Vedbaek, Dänemark) eine theoretische Schmelztemperatur von 64°C, was für den Einsatz als Primerblocker ausreicht, da die Schmelztemperatur des Blockers lediglich über der des Primers liegen muss. Das damit erzielte Detektionslimit ist mindestens 1:100.

Als wichtigstes Kriterium für den Entwurf der Amplifikationsblocker wurde in dieser Arbeit die Schmelztemperatur zwischen dem Blocker und der Wildtypsequenz angenommen. Sie wurde möglichst weit über dem Arbeitsoptimum der Polymerase (ca. 68°C bis 72°C) gewählt, um die Inhibition der Wildtypamplifikation weitgehend sicherzustellen. Bei Blockerschmelztemperaturen von über 85°C sollte die Blockierung des Wildtyps gewährleistet sein.

Die Berechnung der Schmelztemperatur mit TmPredict zeigte eine größere Steigerung der Schmelztemperatur beim Einsatz von LNA-Monomeren im inneren des Blockers als an den Randbereichen. Um Schmelztemperaturen für Amplifikationsblocker weit über der Elongationstemperatur zu erhalten, wurden in dieser Arbeit gezielt diese Basen als LNAs verwendet. Es zeigte sich außerdem, dass kurze Blocker für eine hohe Schmelztemperatur fast ausschließlich aus LNA-Monomeren bestehen müssen (vergleiche Blockersequenzen BRAF-LNA2, b-cat-LNA1 und -LNA2; Tabelle 5.1). Mit den Blockern BRAF-LNA2, b-cat-LNA1 und K-ras-LNA Rox1 wurde ein Detektionslimit von 1:1000 bis 1:10 000 erzielt. Das Detektionslimit für b-cat-LNA2 betrug lediglich 1:10. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich nicht an dem Blocker an sich sondern in der damit erzeugten LNA-DNA-Basenfehlpaarung. Dies wird im entsprechenden Abschnitt weiter unten ausführlicher diskutiert.

You und Kollegen (2006) beschreiben ebenfalls einen Einfluss der Position der Basenfehlpaarung auf die Diskriminierung. Die Schmelztemperatur verringert sich stärker, wenn die Fehlpaarung in der Mitte des Blockers liegt. Dieser Effekt wird allerdings als gering beschrieben, was mit den Beobachtungen für den Blocker K-ras-LNA Rox1 übereinstimmt. Hier befindet sich die Basenfehlpaarung des 16 Basen langen Blockers an vierter Base vom 3'-Ende entfernt, es wird aber trotzdem ein Detektionslimit von 1:1000 erzielt.

Der möglichst vollständigen Unterdrückung des Wildtyps steht die ungehinderte Amplifikation des mutierten Fragments gegenüber. Die ungehinderte Amplifikation der Mutante wurde mit „realtime-SYBRGreen“-PCRs überprüft. Die CT-Wert-Differenz zwischen Reaktionen ohne und mit Blocker waren gering (Tabelle 4.6, 4.8, 4.10). Eine vollständige Unterdrückung des Wildtyps konnte unter den für die Mutante optimalen Bedingungen nicht erzielt werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Blockerbindung eine Gleichgewichtsreaktion ist, bei der der Blocker ständig hybridisiert und

dissoziiert, so dass ein geringer Anteil des Wildtyp-Fragments auch immer ungeblockt vorliegt und amplifiziert werden kann. Dieser ungeblockte Anteil muss möglichst gering sein, was durch einen gut diskriminierenden Blocker erreicht wird. Die gute Diskriminierung spiegelt sich in einer hohen Schmelztemperaturdifferenz zwischen Blocker an Wildtypsequenz und an mutierter Sequenz wider. Diese lässt sich bisher nicht berechnen, sondern müsste empirisch bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die Diskriminierung über die CT-Wert-Differenzen zwischen Wildtyp und Mutante bewertet. Dazu wurde die Kennzahl „Blockereffizienz“ eingeführt.

#### 5.4.2 Die Blockereffizienz als Kennzahl für die LNA-clamp-PCR-Optimierung

Zur Berechnung werden die CT-Werte aus „realtime-SYBRGreen“-PCR-Experimenten verwendet. Die Blockereffizienz ergibt sich aus der Differenz der  $\Delta$ CT-Werte für Wildtyp-DNA und mutierte DNA, und gibt an, in welchem Maß mutierte DNA bevorzugt amplifiziert wird (Tabelle 4.4). Eine hohe Blockereffizienz steht für eine gute Diskriminierung. In Tabelle 5.2 sind die Blockereffizienzen den erzielten Detektionslimits gegenübergestellt.

Gen	Punktmutation	LNA-DNA-Basenfehlpaarung	Blockereffizienz	Erzieltes Detektionslimit
<i>CTNNB1</i>	Codon 45 T → C	T – G	6,4	1:10
<i>BRAF</i>	Codon 600 T → A	T – T	6,8	1:100
<i>BRAF</i>	Codon 600 T → A	A – A	14,1	1:10 000
<i>CTNNB1</i>	Codon 41 A → G	A – C	10,8	1:1000
<i>CTNNB1</i>	Codon 41 C → T	C – A	10,8	1:1000
<i>K-ras</i>	Codon 12 G → T	C – T	13,7	1:1000

Tabelle 5.2: Übersicht über Blockereffizienzen und damit erzielte Detektionslimits für die einzelnen Mutationen und Basenfehlpaarungen zwischen Blocker und DNA

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass eine Blockereffizienz von 10 und mehr zu einem Detektionslimit von 1:1000 führt. Dies entspricht einem mit der in Kapitel 3.1 beschriebenen Formel errechneten Wert, nach der ein um x größerer CT-Wert =  $2^x$  weniger Ausgangs-DNA bedeutet. Für  $x = 10$  ergibt sich eine ca. tausendfach geringere Ausgangs-DNA-Menge. Für die Blockereffizienz der LNA-clamp-PCR für *BRAF* von 14,1 ergibt sich eine um ca. 10 000 fach geringere Ausgangsmenge, was mit dem erzielten Detektionslimit von 1:10 000 übereinstimmt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Blockereffizienzen aus CT-Werten berechnet werden, die in einem gewissen Bereich assaybedingten Schwankungen unterworfen sind. Die Blockereffizienz kann deshalb nur annähernd zur Abschätzung des zu erzielenden Detektionslimits eingesetzt werden.

Da ein Zusammenhang zwischen Blockereffizienz und erzielttem Detektionslimit gesehen wurde, ist die Blockereffizienz eine geeignete Kennzahl zur schnellen und einfachen Beurteilung von Blockern und Clamp-PCR-Bedingungen. Sie kann für zukünftige Entwicklungen und Optimierungen weiterer LNA-clamp-PCRs eingesetzt werden.

#### 5.4.3 Der Einfluss der LNA-DNA-Basenfehlpaarungen auf die Blockierung

Neben LNA-Monomer-Anteil und -Positionen im Blocker und dessen Länge hat die mit der

Zielsequenz erzeugte LNA-DNA-Basenfehlpaarung einen großen Einfluss auf die Diskriminierung zwischen Wildtyp und Mutante und somit auf das zu erzielende Detektionslimit. Dies wurde auch von You und Kollegen (2006) beschrieben.

Tabelle 5.3 zeigt die durch die Blocker erzeugten Basenfehlpaarungen, die erzielten Detektionslimits und die dafür verwendeten Elongationstemperaturen. Zudem ist die Differenz zwischen der Blockerschmelztemperatur an Wildtypsequenz und der Elongationstemperatur, der  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$ -Wert, angegeben. Außerdem sind die  $\Delta T_m$ -Werte für die einzelnen LNA-DNA-Basenfehlpaarungen nach You und Kollegen (2006) aufgeführt. You und Kollegen (2006) hatten die Schmelztemperatur für alle LNA-DNA-Basenfehlpaarungen in der Mitte eines LNA-Triplets über UV-Messung bestimmt. Die  $\Delta T_m$ -Werte sind die Schmelztemperaturdifferenzen berechnet aus der Schmelztemperatur des Blockers an der komplementären Sequenz und der Schmelztemperatur des Blockers bei der jeweilige LNA-DNA-Basenfehlpaarung. Sie stellen ein Maß für die Diskriminierung durch den entsprechenden „Mismatch“ dar.

Blocker	Sequenz 3'-5'	LNA – DNA-Basenfehlpaarung	Blocker schmelztemperatur in °C	Elongationstemperatur in °C	$\Delta T_{m \text{ B-E}}$ in °C	$\Delta T_m$ nach You et al. in °C	Erzieltes Detektionslimit
BRAF-LNA1 (Primerblocker)	aGCtaCaGT <u>G</u> aaa	<b>T</b> – T	64	60 (Annealingtemp.)	4	11,2	1:100
b-cat LNA 2	gcTCCT <u>I</u> CTCTGagt	<b>T</b> – G	86	68, 72	14, 18	8,9	1:10
BRAF LNA2	aGATTTCA <u>A</u> CTGTAGc	<b>A</b> – A	86	74	12	12,3	1:10 000
b-cat-LNA 1	gcCACTA <u>A</u> CCACAGct	<b>A</b> – C	88	68	20	13,7	1:1000
b-cat-LNA 1	gcCACTA <u>C</u> CCACAGct	<b>C</b> – A	88	68	20	15,3	1:1000
K-ras LNA Rox1	tgccataCGCCAC <u>C</u> AGc	<b>C</b> – T	88	66, 68, 70	22, 20, 18	15,7	1:1000

Tabelle 5.3: Übersicht über die verwendeten Blocker, deren Sequenzen, LNA-DNA-Basenfehlpaarungen, Blockerschmelztemperaturen auf komplementären Sequenzen nach TmPredict (exiqon.com), Elongationstemperaturen, Differenz zwischen Blockerschmelztemperatur und optimaler Elongationstemperatur  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$  für optimales Detektionslimit und  $\Delta T_m$  nach You et al. (2006); Großbuchstaben: LNA-Monomer; fett: unterstrichen: mutierte Base

Der Wert  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$  gibt die Differenz zwischen Blockerschmelztemperatur an komplementärer, d. h. Wildtypsequenz, und der Elongationstemperatur, bei der das höchste Detektionslimit erzielt wurde, an. Wird ein hohes Detektionslimit erzielt, dann liegt der  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$ -Wert im Bereich der größten Destabilisierung der Bindung aufgrund der Basenfehlpaarung. Wird mit einer Basenfehlpaarung nur eine geringe Destabilisierung erzielt, also nur eine geringe Temperaturdifferenz zwischen einer Bindung an komplementärem Strang und an einem Strang mit „Mismatch“ (z. B. T – G), muss der  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$ -Wert niedrig sein, um die Amplifikation der mutierten Sequenz zu gewährleisten. Solch eine geringe Differenz führt aber zu einer schlechten Diskriminierung, d. h. die Bindung an dem Wildtyp ist bei dieser Temperatur schlecht und die Amplifikation findet statt. Um den Wildtyp besser zu inhibieren, muss man den  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$ -Wert vergrößern, also die Elongationstemperatur herabsetzen. Bei einer Basenfehlpaarung mit schlechter Diskriminierung führt dies jedoch zur Bindung des Blockers an der mutierten Sequenz und somit zu deren Inhibition.

Der Vergleich der  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$ -Wert mit den  $\Delta T_m$ -Werten zeigt, dass bei einer Annäherung der beiden Werte ein hohes Detektionslimit erzielt wird (BRAF LNA2). Für BRAF (LNA-DNA-Basenfehlpaarung A – A) wurde sie im Bereich von 65°C bis 75°C variiert. Ein Detektionslimit von 1:10 000 wurde bei 74°C erzielt. Bei 70°C und 73°C konnte die Mutante in der 1:1000 Mischung nachgewiesen werden. Bei einem  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$ -Wert von 12°C, der dem  $\Delta T_m$ -Wert von 12,3 sehr nahe kommt, wurde das höchste Detektionslimit mit 1:10 000 erzielt.

Bei *K-ras* (LNA-DNA-Basenfehlpaarung C – T) wurden Elongationstemperaturen von 64°C bis 70°C in 2°C-Schritten getestet. Der deutlichste Nachweis der Mutanten in einer 1:1000 Mischung gelang bei 66°C. Bei 68°C und 70°C ist das mutierte Fragment in der Schmelzkurve ebenfalls noch nachweisbar, bei 64°C nicht. Bei *CTNNB1* wurden mit dem Blocker b-cat-LNA1 für Codon 41 (LNA-DNA-Basenfehlpaarungen A – C bzw. C – A) mit einer Elongationstemperatur von 68°C Detektionslimits von 1:1000 erzielt. Hier wurden keine anderen Elongationstemperaturen getestet. Die  $\Delta T_m$ -Werte wurden bei den Blockern *K-ras*-LNA-Rox1 und b-cat-LNA1 um bis zu 6,3°C überschritten.

Ein niedriger  $\Delta T_m$ -Wert (T – G) steht für eine schlechte Diskriminierung. Hier wird mit einer Überschreitung durch den  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$ -Wert um 5,1°C nur ein Detektionslimit von 1:10 erreicht. Für den „Mismatch“ T – G wurde ein relativ geringer  $\Delta T_m$ -Wert von 8,9°C gefunden. Die Destabilisierung durch die Basenfehlpaarung ist bei diesem „Mismatch“ also nur schwach. Bei einer Elongationstemperatur von 72°C beträgt die  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$  zwischen Blockerschmelztemperatur an der komplementären (Wildtyp-)Sequenz und der Elongationstemperatur 14°C. Solch ein großer Schmelztemperaturunterschied ist durch diese Basenfehlpaarung nicht zu erzielen: das mutierte Fragment wird bei 72°C ebenfalls geblockt. Für eine Erhöhung des Detektionslimits für diese Mutation ist eine weitere Erhöhung der Elongationstemperatur möglich, aber nur im Rahmen des Arbeitsoptimums der Polymerase. Dies reicht möglicherweise nicht aus. Vielmehr sollte ein neuer Blocker für den anderen Strang und somit für die Basenfehlpaarung A – C entworfen werden. Mit dieser Basenfehlpaarung ist aufgrund eines größeren  $\Delta T_m$ -Wertes eine bessere Diskriminierung zu erzielen. Das konnte auch mit dem Blocker b-cat LNA1 gezeigt werden. Eine besonders schlechte Diskriminierung haben You und Kollegen (2006) bei der Basenfehlpaarung G – T festgestellt. Dieser „Mismatch“ wurde im Fall der Mutation *CTNNB1* Codon 41 ACC --> ATC umgangen, indem der Blocker auf den anderen Strang gelegt wurde und somit ein LNA-DNA-„Mismatch“ C – A erzeugt wurde.

Die von You und Kollegen (2006) gemessenen  $\Delta T_m$ -Werte können nur annähernd auf die in dieser Arbeit verwendeten Blocker übertragen werden, da sich die Umgebungssequenzen und die Gesamtzahl der LNA-Basen unterscheiden. Der Vergleich der  $\Delta T_m$ -Werte mit den  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$ -Werten und den Detektionslimits zeigt jedoch, dass die Werte von You und Kollegen (2006) als Anhaltspunkt für den Blockerentwurf und die zu verwendende Elongationstemperatur dienen können. Der  $\Delta T_{m \text{ B-E}}$ -Wert sollte in den Bereich des  $\Delta T_m$ -Werts gelegt werden.

#### 5.4.4 Die Verwendung von LNA als Primerblocker

In dieser Arbeit konnte am Plasmidmodellsystem *BRAF* gezeigt werden, dass LNA-Oligonukleotide als Primerblocker verwendet werden können (Abbildung 4.12). Dabei wird die Bindung eines Primers an der Wildtypsequenz durch den Blocker und somit die Amplifikation dieses Stranges verhindert.

Die Anforderungen an den Blocker bezüglich der Schmelztemperatur unterscheiden sich aufgrund des Assay-Aufbaus etwas von denen bei der Amplifikationsblockierung. Die Blockierung des Wildtyp-Fragments muss in erster Linie während des Primer-Annealings und nicht während der Elongation, wie bei der Amplifikationsblockierung, gewährleistet sein.

Die Blockereffizienz wurde in Abhängigkeit von Primer-Annealingtemperatur, Primermenge und Polymerasemenge bestimmt. Den größten Einfluss zeigt die Primerkonzentration, was aus dem Assay-Aufbau heraus zu erklären ist. Vorwärtsprimer und Blocker konkurrieren um die selbe Bindungsstelle. Bei geringerer Primermenge kann bevorzugt der Blocker binden. Die Verringerung der Polymerasemenge zeigt ebenfalls einen wenn auch geringeren Effekt. Die höchste erzielte Blockereffizienz mit den getesteten Bedingungen ist 6,8. Das damit erzielte Detektionslimit ist 1:100 (Tabelle 5.2).

Die Primer-Annealingtemperatur (60°C) liegt unter der Blockerschmelztemperatur (64°C), so dass der Blocker die Primerbindungsstelle während des Primer-Annealings blockieren kann. Eine Verringerung der Annealingtemperatur könnte zu einer Erhöhung des Detektionslimits führen. Eine Überprüfung steht noch aus.

Die höchste getestete Verdünnung war hier 1:100. Darin konnte das mutierte Fragment nachgewiesen werden. Eine Detektion bei höheren Verdünnungen wurde nicht getestet, wird aber von Prix und Kollegen (2002) beschrieben. Hier wurde mit PNA als Primerblocker ein Detektionslimit von 1:1000 erzielt. Das Erreichen eines Detektionslimits von 1:1000 mit LNA als Primerblocker scheint somit möglich. Eventuell muss ein anderer Blocker mit einer höheren Schmelztemperatur entworfen werden, der eine bessere Diskriminierung zwischen Wildtyp-Fragment und Mutante während der Primerbindung ermöglicht.

Ein Vorteil der Verwendung von Primerblockern gegenüber der von Amplifikationsblockern ist, dass hier keine Synthese des Wildtypstranges stattfindet. Bei dem Einsatz von Amplifikationsblockern entstehen strangaufwärts vom Blocker partielle PCR-Produkte, die eine höhere Annealingtemperatur aufweisen und somit mit größerer Wahrscheinlichkeit zur Amplifikation von Wildtyp-Fragment führen (Oldenburg et al., 2008).

#### 5.4.5 Die Verwendung von LNA als Amplifikationsblocker

Mit der Verwendung von LNA als Amplifikationsblocker konnten in dieser Arbeit Detektionslimits von bis zu 1:10 000 erzielt werden. Bei dieser Methode wird nicht die Bindung des Primers sondern das Fortschreiten der Polymerase auf dem Strang und somit dessen Amplifikation inhibiert. Dieses

Verfahren wurde erfolgreich an den Plasmidmodellsystemen *BRAF*, *K-ras* und *CTNNB1* etabliert.

Bei der Amplifikationsblockervariante muss der Blocker an dem Wildtyp-Fragment besonders während der Elongation, d. h. bei Temperaturen von ca. 68°C bis 72°C, gebunden sein. Es wurden Blocker mit hohen Schmelztemperaturen von 86°C bis 88°C entworfen, um eine möglichst vollständige Inhibition des Wildtyps während der Elongation zu gewährleisten. Die mutierten Fragmente dürfen bei der Elongationstemperatur nicht geblockt werden. Die Destabilisierung durch die jeweilige Basenfehlpaarung muss also in einem Bereich von 14°C bis 20°C liegen. Die optimale Elongationstemperatur wurde empirisch bestimmt (Tabelle 5.3).

Zur Optimierung der LNA-clamp-PCR-Bedingungen wurde auch die Blockerkonzentration variiert. Für *K-ras* wurde die Blockerkonzentration von 0,25 µM auf 0,5 µM verdoppelt. Dies führte bei der Gelauswertung zu einer sichtbar stärkeren Unterdrückung des Wildtyp-Fragments, was auch mit einer Steigerung der Blockereffizienz von 11,2 auf 13,7 einherging. Allerdings wurde auch das mutierte Fragment bei einer höheren Blockerkonzentration leicht inhibiert. Mit einer höheren Blockerkonzentration ist wahrscheinlich die Amplifikation des Wildtyps komplett zu blocken, aber da dann auch das mutierte Fragment inhibiert wird, ist eine Verringerung der Sensitivität des Nachweissystems zu erwarten. Die geringe absolute Kopienzahl der Mutanten, wie sie in Stuhlproben vorliegt, wird dann ebenfalls geblockt.

Bei *BRAF* hatte die Erhöhung der Blockerkonzentration von 0,4 µM auf 1 µM keinen nachweisbaren Einfluss auf das Detektionslimit. Es betrug in beiden Fällen 1:1000. Mit einer Blockerkonzentration von 0,8 µM wurde ein Detektionslimit von 1:10 000 erzielt. Dies ist wahrscheinlich auf die optimale Elongationstemperatur zurückzuführen, die mit 0,4 µM und 1 µM nicht getestet wurde. Außerdem wurde eine Verringerung der Blockerkonzentration um 1/20 auf 0,05 µM getestet. Die damit erzielten Blockereffizienzen entsprachen bei gleichen Temperaturprofilen denen mit 0,4 µM. Diese Beobachtung spricht dafür, dass der Einfluss der Blockerkonzentration im getesteten Bereich geringer ist als der der Elongationstemperatur. Bei einer weiteren Optimierung und bei der Entwicklung sollte die kleinstmögliche Blockerkonzentration bestimmt werden, da der Blocker eine relativ teure Komponente ist.

Zur Optimierung der LNA-clamp-PCR wurde auch die Magnesiumchloridkonzentration variiert. Laut You und Kollegen (2006) sind Magnesiumchlorid-Interaktionen mit dem Blocker-DNA-Duplex nicht „Mismatch“-spezifisch. Somit sollte die Magnesiumchloridkonzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Diskriminierung haben. Dies wurde durch die Titration der Magnesiumchloridkonzentration von 3 µM bis 6 µM im Nachweissystem von *BRAF* überprüft und konnte bestätigt werden (Daten sind nicht gezeigt).

Von Luo und Kollegen (2006) wurde beschrieben, dass die Entfernung zwischen Primer und Blocker ein Faktor ist, der zur erfolgreichen Unterdrückung der Amplifikation des Wildtyps beiträgt. Der Abstand der Polymerase zwischen Primer und Blocker soll möglichst groß (größer als 28 bp) sein, da in der Phase der Temperaturerhöhung von der Elongationstemperatur, in der der Blocker bindet,

zu der Denaturierungstemperatur der Blocker dissoziiert und die Polymerase für einen sehr kurzen Zeitraum die Polymerisation des nun ungeblockten Wildtyps fortsetzen kann. Ob die Polymerase die Polymerisation beenden kann, hängt von der Distanz ab. Es wird beschrieben, dass Entfernungen von 97 Basen und mehr zu einer erfolgreichen Unterdrückung beitragen, während 28 Basen zu kurz sind. Als Blocker wurde ein 17mer aus PNA-Monomeren verwendet, der trotz seiner Länge nur eine Schmelztemperatur von 69°C aufweist. Um dieses Problem zu umgehen, wurden in den in dieser Arbeit entwickelten Nachweissystemen Entfernungen von Blocker zum Ende des Gegenstrangs von mindestens 85 bp nicht unterschritten. Zudem haben die verwendeten Blocker eine höhere Schmelztemperatur von 86°C bzw. 88°C, die bereits über der Arbeitsoptimum der Polymerase liegt. Somit scheint die Entfernung von Blocker zum Strangende kein entscheidender Faktor zu sein.

#### **5.4.6 Die Verwendung von Polymerase ohne 5'-3'-Exonukleasefunktion**

Von Dominguez und Kolodney (2005) wurde gezeigt, dass die Verwendung von Taq DNA Polymerase mit 5'-3'-Exonukleasefunktion in Verbindung mit LNA-Blocker nicht zu einer Inhibition der Wildtypamplifikation führt, da der Blocker hydrolysiert wird. Sie postulieren die Verwendung von einer Polymerase ohne Stoffelfragment, die die 5'-3'-Exonukleasefunktion nicht aufweist. Senescau und Kollegen (2005) verwendeten erfolgreich eine Polymerase mit Exonukleasefunktion.

In dieser Arbeit wurden die meisten Experimente mit einer Polymerase mit Exonukleasefunktion (FastStart Taq, Roche Diagnostics) durchgeführt. Das damit erzielte Detektionslimit beträgt bis zu 1:10 000.

Es wurden zusätzlich Experimente mit einer Polymerase ohne Stoffelfragment (KleinTaq, Bioron) gemacht, um den Einfluss der Exonukleaseaktivität auf die Blockereffizienz zu untersuchen. Die Versuche wurden am Plasmidmodellsystem *BRAF* durchgeführt. Es war zu erwarten, dass eine Hydrolyse des Blockers besonders auf dem Wildtyp-Fragment stattfindet, da nur auf diesem der Blocker bei der Elongationstemperatur auch gebunden ist. Findet diese Hydrolyse an der Wildtypsequenz statt, nicht aber an der mutierten Sequenz, würde sich eine geringere Blockereffizienz ergeben.

Beobachtet wurden mit der Polymerase ohne Exonukleasefunktion bei vergleichbaren Blockereffizienzen ein größerer  $\Delta$ CT-Wert sowohl für Wildtyp als auch für Mutante. Der Einsatz von weniger Blocker führte zu einer Verringerung der  $\Delta$ CT-Werte bei beiden Sequenzen. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich keine Aussage zu einer stattfindenden Hydrolyse des Blockers machen. Die stärkere Blockierung beider Sequenzen könnte z. B. auf eine höhere Affinität des Blockers unter den veränderten Salzkonzentrationen des KleinTaq-Puffers zurückzuführen sein. Weitere Experimente, die zur Klärung beitragen könnten, wurden nicht durchgeführt.

Die Verwendung von Polymerase mit und ohne Exonukleasefunktion ist also möglich. Es kann in beiden Fällen unter optimierten Bedingungen ein Detektionslimit von mindestens 1:1000 erzielt werden. Es muss in weiteren Experimenten geklärt werden, ob zur Verbesserung des

Detektionslimits die Verwendung einer Polymerase ohne Exonukleasefunktion erforderlich ist.

## 5.5 Vergleich der etablierten Nachweisverfahren mit der Literatur

Mit der zunehmenden Bedeutung der Analyse von SNPs bzw. Punktmutationen z. B. in der Diagnostik und Pharmakogenetik wurden eine Reihe von Technologien zur deren Analyse entwickelt. Für die nichtinvasive Krebsdiagnostik bzw. Prognostik an Körperflüssigkeiten sind besonders sensitive Methoden notwendig, die die Mutationen auch im hohen Hintergrund nichtmutierter Sequenzen nachweisen können. Eine Übersicht über Nachweisverfahren für Punktmutationen, die in Körperflüssigkeiten oder Stuhl erfolgreich angewendet wurden, befindet sich in Tabelle 5.4. Dabei wurden nur Methoden berücksichtigt, die universell für verschiedene Gene einsetzbar sind. Das relative Detektionslimit ist mit aufgeführt, soweit es angegeben wird.

Methode	Erkrankung	Gene	Medium	Detektionslimit	Publiziert von
Allelspezifische PCR	Darmkrebs	<i>K-ras</i>	Stuhl		Hasegawa et al., 1995; Smith-Ravin et al., 1995
Heteroduplexanalyse	Darmkrebs	<i>K-ras</i> bzw. <i>APC</i>	Stuhl		Villa et al., 1996; Deuter und Müller, 1998
Mutant enriched PCR	Darmkrebs	<i>K-ras</i>	Stuhl		Berndt et al., 1998; Haug et al., 2007
Oligonukleotidligation LDR (ligase detection reaction)	Darmkrebs	<i>K-ras</i>	Stuhl	0,1%	Jen et al., 1998
Digital PCR	Darmkrebs	<i>ras</i>	Stuhl	Theoretisch 0,1%,	Vogelstein und Kinzler, 1999
Clamp-PCR mit PNA als Primerblocker	Darm- und Pankreaskrebs	<i>K-ras</i>	Stuhl	0,1%	Prix et al., 2002
BEAMing	Darmkrebs	<i>APC, K-ras, TP53, PIK3CA</i>	Stuhl	0,01%	Diehl et al., 2008
PCR-SSCP	Darmkrebs Stadien C und D nach OP zur Prognose	<i>APC, Kras, p53</i>	Plasma		Wang et al, 2004
Invader	Faktor V , Mukoviszidose z. B.		Blut	0,1%	Kwiatkowski et al., 1999
APRIL-ATM	Lungenkrebs	<i>Ku, p53</i>	Gewebe	0,00016%	Kaur et al., 2002
Proofreading PCR		<i>Ha-ras (Maus)</i>		0,1% bis 0,01%	Wegmüller et al., 1995
Clamp-PCR mit PNA als Amplifikationsblocker	Cholangiokarzinom bzw. Pankreaskrebs	<i>K-ras</i>	Gallenflüssigkeit bzw. Serum	0,03% bzw. 0,01%	Chen et al., 2004; Luo et al., 2006
Clamp-PCR mit LNA als Primerblocker und allelspezifischem Primer	Melanome	<i>BRAF</i>	Blut		Oldenburg et al., 2008
Clamp-PCR mit LNA als Amplifikationsblocker	Melanom bzw. in <i>Plasmodium falciparum</i>	<i>BRAF</i> bzw. <i>Pfcr</i>	Gewebe	1% bzw 0,0625%	Dominguez und Kolodney, 2005; Senescau et al., 2005

Tabelle 5.4: Übersicht über bisher publizierte Nachweismethoden für Punktmutationen mit hohen Detektionslimits

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass eine Reihe von Verfahren bereits in Stuhlproben erfolgreich

Anwendung fanden. Allerdings wurden in den meisten Fällen nur Proben von Patienten mit Karzinomen untersucht, in denen der Anteil der DNA aus Krebszellen in den Stuhlproben aufgrund des größeren Anteils von verändertem Gewebe im Darm höher ist als in Patienten mit Vorstufen von Darmkrebs (Whitney et al., 2004). Für eine Diagnostik, die das Ziel hat, die Fälle von Darmkrebs in der Bevölkerung durch Früherkennung zu reduzieren, ist jedoch die Erkennung von frühen Stufen von besonderer Bedeutung. Nur die frühe Diagnose von Adenomen führt zu einer Reduzierung der Darmkrebsfälle (Atkin, 2003).

Das höchste Detektionslimit wird mit der Methode BEAMing mit 0,01% erreicht (Diehl et al., 2008). Diese Methode wird bereits für die Verwendung in einem Diagnostischen Test für Darmkrebs weiterentwickelt. Gleiches gilt für die „Mutant enriched“-PCR, die bereits von der Firma Invitek (Berlin) in einem Testsystem kommerziell vertrieben wird. Durch die Kombination von Methoden wurden Verfahren mit sehr hohen Detektionslimits entwickelt, z. B. stellt die APRIL-ATM (amplification via primer ligation at the mutation) eine Kombination aus RFLP und Oligonukleotidligation dar und erzielt ein Detektionslimit von 0,00016% (Kaur et al., 2002). Solche Verfahren sind allerdings sehr arbeitsaufwendig.

Als ein schnelles Verfahren mit wenig Arbeitsschritten und geringer Fehleranfälligkeit wurde in dieser Arbeit die LNA-clamp-PCR identifiziert. Es wurden damit Detektionslimits von bis zu 1:10 000 erzielt. Senescau und Kollegen (2005) beschreiben einen LNA-clamp-PCR mit LNA als Amplifikationsblocker. Die Schmelztemperatur des Blockers wird mit 75°C angegeben, die Elongationstemperatur beträgt 76°C. Es wird ein Detektionslimit von 1:1600 erzielt. Bei den verwendeten Temperaturen könnte man auch eine Amplifikation des Wildtyp-Fragments erwarten. Dies wird möglicherweise durch den Einsatz einer hohen Blockerkonzentration von 2 µM weitgehend verhindert. Dominguez und Kolodney (2005) erzielten unter Verwendung eines Blockers mit einer Schmelztemperatur von 82°C (nach TmPredict, exiqon.com) und einer Elongationstemperatur von 72°C ein Detektionslimit von mindestens 1:100. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse der LNA-clamp-PCR konnten in dieser Arbeit bestätigt und verbessert werden.

Für erfolgreich in Stuhlproben angewendete Nachweismethoden werden Detektionslimits von 1:1000 bis 1:10 000 angegeben. Dies konnte mit der LNA-clamp-PCR in dieser Arbeit ebenfalls erreicht werden.

## **5.6 Erzielte Detektionslimits in Hinblick auf die Analyse von Stuhlproben**

Aus Studien ist bekannt, dass der Anteil an Tumor-DNA in Stuhlproben zwischen 0,4% (Traverso et al., 2002) und 5% (Jen et al., 1998) liegt. Punktmutationen, die zu solch einem geringen Anteil vorliegen, sind ohne vorherige Anreicherung nicht nachweisbar. Die Fähigkeit eines Verfahrens zur Anreicherung wird über das relative Detektionslimit bestimmt und sollte für Stuhlproben danach mindestens 1:500 bis 1:1000 betragen. Bisher veröffentlichte Untersuchungen von Punktmutationen in Stuhlproben sind erfolgreich mit der Verwendung von Verfahren mit einem Detektionslimit von

1:1000 (Tabelle 5.4). Bei Vorstufen von Darmkrebs, also Adenomen, ist ein geringerer Anteil mutierter DNA im Stuhl vorhanden als bei späten Stadien. Whitney und Kollegen (2004) postulieren einen Anteil von unter 1%. Verfahren, die ein Detektionslimit von 0,1% aufweisen, sind also theoretisch geeignet zur Frühdiagnostik von Darmkrebs.

In vier von fünf in dieser Arbeit etablierten Nachweissystemen wurde ein Detektionslimit von mindestens 1:1000 erzielt. Die Anwendbarkeit zur Frühdiagnostik muss an Patientenstuhlproben verifiziert werden. Dazu müssen in einem ersten Schritt Biopsieproben aus der Koloskopie von Patienten mit frühen Stufen auf das Vorhandensein von Punktmutationen untersucht werden. Anschließend müssen die dazu passenden Patientenstuhlproben mit dem entwickelten Nachweissystemen analysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Experimente nicht durchgeführt werden, da keine entsprechenden Patientenproben verfügbar waren. In einem Folgeprojekt wird dies nun nachgeholt.

### 5.6.1 Weitere Verbesserung des Detektionslimits

Sollte sich bei der Analyse von Patientenstuhlproben herausstellen, dass ein Detektionslimit von 1:1000 zu gering ist, wäre durch unterschiedliche Maßnahmen eine weitere Erhöhung der Detektionslimits möglich. Zum einen könnten die Bedingungen der LNA-clamp-PCRs weiter optimiert werden. Von Gilje et al. (2008) wird der Einsatz von High Fidelity DNA Polymerase in einem Nachweissystem für Mutationen in *K-ras* mit PNA als Blocker beschrieben. Dadurch konnte das Detektionslimit von 1:2000 auf 1:20 000 erhöht werden. Diese Beobachtung wird zurückgeführt auf den fehlerhaften Einbau von Basen im Bereich der Blockerbindungsstelle durch die Taq-Polymerase. Hancock und Kollegen (2002) beschreiben die Verwendung von zwei PNA-Amplifikationsblockern, mit denen beide Wildtypstränge geblockt werden sollen. Dazu werden die Blocker so entworfen, dass sie nur gering überlappen, um eine Bindung aneinander zu verhindern. Dies bedeutet aber auch, dass sich die Position der Basenfehlpaarung jeweils am Rand des Blockers befindet, was für die diskriminierenden Eigenschaften ungünstig ist (You et al., 2006). Zu dem mit dieser Variante erzielbarem Detektionslimit wird bei Hancock und Kollegen (2002) keine Angabe gemacht.

Auch durch das verwendete Detektionssystem zur Analyse der in der LNA-clamp-PCR angereicherten mutierten Fragmente ist noch eine Erhöhung des Detektionslimits möglich. Ziel ist die Verwendung von DNA-Chips. Diese Methode weist ebenfalls eine gewisse Sensitivität auf, so dass sich mutierte Sequenzen in einem Hintergrund von Wildtypsequenzen nachweisen lassen. Diese Sensitivität könnte weiter durch die Anwesenheit der LNA-Blocker aus der LNA-clamp-PCR, die die Bindungsstelle des Wildtyps für die Sonden des Chips blockieren, begünstigt werden.

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung des Detektionslimits wäre eine sequenzspezifische Aufreinigung. Vor dem Einsatz der aus Stuhl extrahierten genomischen DNA könnten mittels biotinylierter Oligonukleotide gezielt die mutierten Fragmente gebunden und mit Streptavidin-„beads“ aufgereinigt werden. Diese Methode wurde von Ahlquist und Kollegen (2000) als „hybrid capture“-Methode zur Erhöhung der absoluten Sensitivität des Nachweises von Tumor-DNA in Stuhl angewendet. Damit

wird der Anteil von DNA eines Genfragments in der Gesamt-DNA erhöht. Das führt zur Anreicherung von Wildtyp- und mutiertem Fragment in einen zuverlässiger nachweisbaren Bereich, da für jede Nachweismethode eine Mindestmenge an Kopienzahlen erforderlich ist.

Zur Erhöhung der Sensitivität des Nachweissystems, insbesondere beim Einsatz in Stuhlproben, wurde von Diehl und Kollegen (2008) eine weitere Maßnahme vorgeschlagen. In der von ihnen durchgeführten Studie wurde festgestellt, dass ein großer Anteil der DNA eine Fragmentgröße von unter 200 bp aufweist. Daher ist es empfehlenswert, möglichst kurze Amplikons zu entwerfen.

## 5.7 Universelle Einsetzbarkeit der LNA-clamp-PCR

Zur Überprüfung der universellen Anwendbarkeit der LNA-clamp-PCR für alle Gene und korrespondierende Punktmutationen wurde das System an verschiedenen Punktmutationen getestet. Dazu wurden sowohl unterschiedliche Gene als auch innerhalb dieser Gene verschiedene Mutationen untersucht, da die Blockereigenschaften sowohl von der Basenfehlpaarung als auch von der Umgebungssequenz abhängen (You et al., 2006). In Tabelle 5.5 sind alle möglichen Punktmutationen und die dadurch bei Verwendung von Blockern erzeugten LNA-DNA-Basenfehlpaarungen aufgeführt. Fehlpaarungen, für die in der vorliegenden Arbeit ein Nachweissystem entwickelt wurden, sind blau dargestellt.

Punktmutation	LNA – DNA-Basenfehlpaarung auf sense Strang	LNA – DNA-Basenfehlpaarung auf antisense Strang	Erzielte Detektionslimit	Häufigkeit der Punktmutation
<b>T → A</b>	<b>A – A</b>	<b>T – T</b>	1:10 000 bzw. 1:100 (Primerblockerassay)	49 / 213
<b>T → C</b>	A – C	<b>T – G</b>	1:10	1 / 213
T → G	A – G	T – C		1 / 213
<b>A → G</b>	T – G	<b>A – C</b>	1:1000	10 / 213
A → C	T – C	A – G		0 / 213
<b>A → T</b>	T – T	A – A		0 / 213
<b>C → T</b>	G – T	<b>C – A</b>	1:1000	1 / 213
<b>C → A</b>	G – A	C – T		0 / 213
C → G	G – G	C – C		0 / 213
<b>G → T</b>	<b>C – T</b>	G – A	1:1000	11 / 213
<b>G → A</b>	C – A	G – T		45 / 213
G → C	C – C	G – G		1 / 213

Tabelle 5.5: Alle Punktmutationen, die dadurch erzeugten LNA-DNA-Basenfehlpaarungen auf sense- und antisense-Strang, die erzielten Detektionslimits und die Häufigkeit der Punktmutationen in den für die Vorstudie analysierten 213 Proben; grün: Punktmutationen, die mit den getesteten LNA-DNA-Basenfehlpaarungen detektiert sind; blau: getestete LNA-DNA-Basenfehlpaarungen

Da der Blocker sowohl auf den sense- als auch auf den antisense-Strang gelegt werden kann, können mit einer LNA-DNA-Basenfehlpaarung zwei verschiedene Punktmutationen angereichert werden. Alle Punktmutationen, die mit den getesteten LNA-DNA-Basenfehlpaarung erfasst werden, sind in Tabelle 5.5 grün dargestellt. Die Punktmutation T → C wurde mit einem Blocker auf dem antisense-Strang und der LNA-DNA-Basenfehlpaarung T – G angereichert. Dies ist eine schlecht

diskriminierende Basenfehlpaarung (siehe Kapitel 5.4.3). Zur Anreicherung dieser Punktmutation sollte der Blocker auf den sense-Strang mit der Basenfehlpaarung A – C gelegt werden. Ebenso ist laut You und Kollegen (2006) die Basenfehlpaarung G – T zu vermeiden. Für die nicht erfassten Punktmutationen sind laut You und Kollegen (2006) die LNA-DNA-Basenfehlpaarungen C – C bzw. T – C empfehlenswert.

Von den 12 theoretisch möglichen Punktmutationen können acht mit den getesteten LNA-DNA-Basenfehlpaarungen und die vier weiteren mit zwei als gut diskriminierend beschriebenen angereichert werden. Die Anreicherung gelang im Fall von vier unterschiedlichen Umgebungssequenzen. Folglich scheint die LNA-clamp-PCR für jedes Gen und dessen Punktmutationen einsetzbar zu sein.

Für die Vorstudie zur Erstellung eines Markersets wurden insgesamt 213 Patientenbiopsieproben analysiert. Die Häufigkeit der gefundenen Punktmutationen ist in Tabelle 5.5 aufgeführt, wobei die einzelnen Punktmutationen für die drei untersuchten Genfragmente *BRAF*, *CTNNB1* und *K-ras* zusammengefasst wurden. Für alle häufig auftretenden Punktmutationen konnte in dieser Arbeit eine gut diskriminierende LNA-DNA-Basenfehlpaarung gefunden werden. Somit kann die LNA-clamp-PCR für alle Punktmutationen der Markergene eingesetzt werden und ist eine geeignete Methode für das zu entwickelnde Nachweissystem für Darmkrebs und dessen Vorstufen an Stuhlproben.

## 5.8 Ausblick

Die entscheidende Methode für ein Nachweissystem von Darmkrebsdiagnostik im Frühstadium in Stuhlproben, das Verfahren zur Anreicherung der Punktmutationen, ist in dieser Arbeit entwickelt worden. Dies ist die Grundlage für die Detektion der veränderten DNA, die in Stuhlproben im hohen Hintergrund von Wildtyp-DNA vorliegt. Die Methode wurde beispielhaft an einzelnen Punktmutationen für alle drei Genfragmente des Markersets aus der Vorstudie etabliert. Das dabei erzielte Detektionslimit von 1:1000 bis 1:10 000 ist nach Literaturangaben ausreichend für den Nachweis von DNA aus frühen Stufen in Stuhlproben. Es konnte die universelle Einsetzbarkeit des Verfahrens gezeigt werden. Für die Ausweitung der Methode auf die restlichen Punktmutationen des Markersets wurden Richtlinien ausgearbeitet und die Blockereffizienz als Kennzahl eingeführt.

In einem nächsten Schritt muss eine geeignete Detektionsplattform gefunden und etabliert werden. Vorstellbar wäre die Verwendung eines DNA-Chips. Ein relativ kostengünstiges Chipsystem, bei dem sich der Biochip in einem Eppendorfgefäß befindet, bietet beispielsweise die Firma CLONDIAG GmbH (Jena) an. Die Einsetzbarkeit dieses Systems muss in kommenden Experimenten geklärt werden. Außerdem muss die Anwendbarkeit der LNA-clamp-PCR an Patientenstuhlproben gezeigt werden. Da bereits ein ähnliches Verfahren unter Verwendung von PNA in Stuhlproben erfolgreich eingesetzt wurde (Prix et al., 2002), kann davon ausgegangen werden, dass der Transfer der Methode auf Stuhlproben erfolgreich ist.

In einer anschließenden Validierung des Nachweissystems an Patientenstuhlproben muss die erzielbare Sensitivität und Spezifität gezeigt werden. Die Sensitivität ist nur teilweise von dem relativen Detektionslimit abhängig, welche lediglich die technische Leistungsfähigkeit der Methode beschreibt. Die klinische Sensitivität des Nachweissystems ergibt sich aus der technischen Leistungsfähigkeit und der Sensitivität der analysierten Marker.

Das in der Vorstudie entwickelte Markerset weist für frühe Stufen (Adenome und hyperplastische Polypen) eine Sensitivität von 72,2% auf, für Karzinome wurde eine Sensitivität von 76,4% ermittelt. Im Vergleich zu anderen nicht invasiven Nachweissystemen ist diese Sensitivität relativ hoch. Der routinemäßig eingesetzte Hämokulttest weist laut Tibble und Kollegen (2001) eine Gesamtsensitivität für alle Darmkrebsstadien von 43% auf und für Adenome von 17% (Ahlquist et al., 2008). Der momentan von der Firma EXACT Sciences (Massachusetts, USA) entwickelte Test mit DNA-Markern in Stuhl erreicht für Adenome größer 1 cm eine Sensitivität von 43% (Ahlquist et al., 2008). Der bei der Firma Epigenomics AG (Berlin) in der Entwicklung befindliche Methylierungsmarker SEPT9 zeigt in Plasmaproben von Patienten mit Karzinomen eine Sensitivität von 69% (Lofton-Day et al. 2008). Das dieser Arbeit zugrunde liegende Markerset weist eine Sensitivität auf, die mit anderen nichtinvasiven Nachweissystemen vergleichbar ist.

Alternativ zu Stuhlproben werden auch Nachweissysteme für Blut bzw. Plasma entwickelt. Die Analyse von Plasmaproben zur Darmkrebsdiagnostik wurde von Diehl und Kollegen (2008) mit der von Stuhlproben verglichen. Es wurden Mutationen in 92% der Stuhlproben aber nur 50% der korrespondierenden Plasmaproben gefunden. Ein Vorteil von Stuhlproben ist, dass der Anteil mutierter DNA für frühe Stadien genauso hoch ist wie für späte. In Plasma ist die Konzentration mutierter DNA bei frühen Stadien geringer als in späten. Noch größer ist der Unterschied bei späten Adenomen: die mutierte DNA ist im Plasma nur schwer nachweisbar. Für die Frühdiagnostik sind diese Stufen jedoch besonders relevant. Stuhlproben sind folglich für die Frühdiagnostik von Darmkrebs besser geeignet als Blutproben.

Das hier vorgestellte Verfahren der LNA-clamp-PCR ist universell für den Nachweis aller Punktmutationen in hohem Wildtypüberschuss einsetzbar. Zudem ist es in allen Arten von Körperflüssigkeiten wie Blutproben (Gesamtblut, Serum oder Plasma), Urin, Sputum oder Gallenflüssigkeit anwendbar. Dies ermöglicht die Verwendung der Methode zur Diagnostik oder Prognostik anderer Krebsarten, bei denen Punktmutationen auftreten. Gegenwärtig werden im Cancer Genome Project verschiedene Krebsarten auf typische Mutationen untersucht. Aus dieser großen Anzahl von Daten können neue Markersets zur Diagnostik entwickelt werden und mit der vorliegenden Methode zu einem Nachweissystem weiterentwickelt werden.

Die Wirksamkeit einiger Krebsmedikamente ist nur bei dem Vorhandensein bestimmter Mutationen gegeben. Beispielweise ist die Anwendbarkeit des Medikaments Gefitinib (ein Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors) nur bei Mutationen des EGFR-Gens erfolgreich (Nagai et al. 2005). Zum Nachweis dieser Mutationen, aber auch anderer prädiktiver Marker, wäre die LNA-clamp-PCR einsetzbar.

## 6 Zusammenfassung

Darmkrebs ist die zweithäufigste malignombedingte Todesursache in den westlichen Industrieländern. Durch eine frühzeitige Diagnose besteht jedoch eine hohe Chance auf Heilung. Der Goldstandard zur Darmkrebsfrüherkennung ist gegenwärtig die Koloskopie. Eine Darmspiegelung ist jedoch invasiv und mit Unannehmlichkeiten für den Patienten verbunden. Die Akzeptanz in der Bevölkerung ist daher gering. Ziel des BMBF-Projektes „Entwicklung eines nichtinvasiven Nachweissystems zur Früherkennung von humanem Darmkrebs“, in dessen Rahmen diese Arbeit entstand, ist die Bereitstellung eines nichtinvasiven Nachweisverfahrens zur Darmkrebsfrüherkennung. Der Nachweis soll über die Detektion von aus neoplastischen Zellen stammender DNA in Stuhl erfolgen. Die Entartung dieser Zellen beruht auf Veränderungen im Erbgut, welches unter anderem Mutationen sind. Im ersten Teil des BMBF-Projektes wurde ein Set von Mutationen zusammengestellt, welches eine hohe Sensitivität für Vorstufen von Darmkrebs aufweist.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Nachweismethode für die zuvor identifizierten Punktmutationen zu entwickeln. Das Nachweisverfahren musste dabei unempfindlich gegen einen hohen Hintergrund nichtmutierter DNA sein, da im Stuhl geringe Mengen DNA aus neoplastischen Zellen bei einem hohen Hintergrund von DNA aus gesunden Zellen vorliegen. Hierzu wurden Plasmidmodellsysteme für die aus dem Marker-Set stammenden Genfragmente *BRAF* und dessen Mutante V600E, *CTNNB1* und T41I, T41A, S45P und *K-ras* G12C hergestellt. Mit Hilfe dieser Plasmidmodellsysteme wurde dann das Nachweissystem entwickelt.

Der entscheidende Schritt für die Detektion von Punktmutationen bei hohem Wildtypüberschuss ist eine vorhergehende Anreicherung. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu die Methode der LNA-clamp-PCR (locked nucleic acid) etabliert. Die Bewertung der erzielten Anreicherung erfolgte über das relative Detektionslimit. Zur Bestimmung des Detektionslimits wurde die Schmelzkurvenanalyse von Hybridisierungssonden eingesetzt; diese wurde im Rahmen dieser Arbeit für die drei oben genannten Genfragmente und ihre Mutanten entwickelt.

Die LNA-clamp-PCR wird in Anwesenheit eines LNA-Blockers durchgeführt. Das Nukleotidanalogen LNA weist im Vergleich zu DNA eine erhöhte Affinität zu komplementären DNA-Strängen auf. Gleichzeitig kommt es bei Anwesenheit einer Basenfehlpaarung zu einer größeren Destabilisierung der Bindung. Als Blocker werden kurze LNA-DNA-Hybridoligonukleotide eingesetzt, die den mutierten Sequenzbereich überspannen und selbst der Wildtypsequenz entsprechen. Durch Bindung an die Wildtypsequenz wird deren Amplifikation während der PCR verhindert (clamp = arretieren, festklemmen). Der Blocker selbst wird dabei nicht verlängert. Der Blocker bindet unter optimalen Bedingungen jedoch nicht an die mutierte Sequenz. Die Mutante wird daher ungehindert amplifiziert und somit gegenüber dem Wildtyp-Fragment angereichert. Die Position des Blockers kann im Bindungsbereich eines der Primer sein und hier dessen Hybridisierung an dem Wildtyp-Fragment verhindern oder zwischen den beiden Primern liegen und so die Synthese durch die

Polymerase inhibieren. Die Anwendbarkeit beider Systeme wurde in dieser Arbeit gezeigt.

Die LNA-clamp-PCR mit Primerblocker wurde für *BRAF* etabliert. Es wurde ein Detektionslimit von mindestens 1:100 erzielt. Die LNA-clamp-PCR mit Amplifikationsblocker wurde erfolgreich für *BRAF*, *K-ras* und *CTNNB1*: T41I, T41A mit einem Detektionslimit von 1:1000 bis 1:10 000 entwickelt. In Stuhlproben liegt DNA aus neoplastischen Zellen nach Literaturangaben zu einem Anteil von 1% bis 0,1% vor. Die LNA-clamp-PCR weist also mit Amplifikationsblockern ein ausreichend hohes Detektionslimit für die Analyse von Stuhlproben auf. Durch die erfolgreiche Etablierung der Methode auf drei verschiedenen Genfragmenten und vier unterschiedlichen Punktmutationen konnte deren universelle Einsetzbarkeit gezeigt werden. Für die Ausweitung der LNA-clamp-PCR auf die übrigen Mutationen des Marker-Sets wurden Richtlinien ausgearbeitet und die Blockereffizienz als Kennzahl eingeführt. Die LNA-clamp-PCR ist ein schnelles, kostengünstiges Verfahren, welches einen geringen Arbeitsaufwand erfordert und wenig fehleranfällig ist. Sie ist somit ein geeignetes Anreicherungsverfahren für Punktmutationen in einem diagnostischen System zur Darmkrebsfrüherkennung. Darüber hinaus kann die LNA-clamp-PCR auch in anderen Bereichen, in denen die Detektion von Punktmutationen in einem hohen Wildtypintergrund erforderlich ist, eingesetzt werden.

## 7 Summary

Colon cancer is the second leading cause of cancer related deaths in the western world. However if diagnosed early there is a great chance curing the disease. Colonoscopy is the gold standard for early detection of colorectal cancer today. Its greatest disadvantage is the fact that it is an invasive technique and provides some discomfort for the patients. Therefore, the compliance to undergo such a procedure is extremely low. This work was generated in the context of the BMBF-project „ Development of a non-invasive assay for the early detection of preneoplastic and neoplastic lesions in the human colon“. The aim of the work described here is the development of a non-invasive assay for the early detection of colon cancer. The assay should detect DNA from neoplastic cells in feces samples. The transformation of these cells is based on alterations in the genome predominantly mutations. In the first part of the BMBF-project a mutation panel with high sensitivity for preneoplastic lesions of colon cancer was determined.

The aim of this work was to develop a detection method for the point mutations of the determined mutation panel. The rare mutant DNA needs to be detected in the presence of a great amount of wild-type DNA shed from healthy tissue. The assay system needs to be insensitive to this high background of healthy DNA. Therefore a model system of plasmid DNA containing gene fragments of *BRAF* and its mutation V600E, *CTNNB1* and T41I, T41A, S45P and *K-ras* G12C obtained from the marker panel was established. Using these plasmid system the detection method was developed.

The most critical parameter for the detection of rare point mutations is an enrichment of these rare DNA molecules. In this work LNA-clamp-PCR (locked nucleic acid) technology was used to enrich the mutant DNA.. For the estimation of the achieved enrichment the relative detection limit was used. The detection limit was determined by melting curve analysis of hybridization probes. These assays were established in the present work for the three above mentioned gene fragments.

LNA-clamp-PCR is performed in the presence of an LNA blocker. LNA is a synthetic DNA analog. LNA nucleotide analog bind to complementary DNA strands with higher affinity. In addition a single mismatch in the LNA-DNA duplex causes a much greater destabilization compared to a DNA-DNA duplex. Short LNA-DNA-hybrids were used as clamp, which cover the mutated region and represent the wild-type sequence. Within an appropriate temperature range, LNA can specifically bind to wild type template and can inhibit its amplification. The clamp itself will not be elongated. Under optimal conditions the LNA clamp will not interfere with the amplification of the mismatched template. Therefore the mutated gene fragment will be enriched in comparison to the wild-type. The position of the LNA clamp can either be at the primer binding site inhibiting primer hybridization on the wild-type fragment or the LNA clamp is positioned between the two primer binding sites inhibiting chain elongation of the perfectly matched template. In the present work both systems were applied.

For the gene fragment *BRAF* the LNA was used at the primer binding site. The achieved detection limit was at least 1:100. The LNA-clamp-PCR with LNA inhibiting the chain elongation were developed successfully for *BRAF*, *K-ras* and *CTNNB1*: T41I, T41A achieving a detection limit of 1:1000 to 1:10 000. According to the literature 1% to 0.1% of the DNA in feces derives from neoplastic cells. Therefore the detection limit achieved by LNA-clamp-PCR with LNA inhibiting chain elongation would be sufficient for analyzing feces samples. LNA-clamp-PCR protocols were established for three different gene fragments and four diverse point mutations indicating that the technology can generally be used for high sensitive detection of DNA mutations. For the development of LNA-clamp-PCR protocols for the other mutations of the marker panel development guidelines were established. Clamp efficiency was identified as a quantitative parameter for protocol optimization. The LNA-clamp-PCR is a robust, fast and cost-saving technique which needs low labor input. Therefore the method is adequate for enriching point mutated gene fragments in a diagnostic assay for the detection of early colon cancer stages. In addition LNA-clamp-PCR can be applied in other fields where rare sequence variations need to be detected in the presence of high wild-type DNA background.

## 8 Literaturverzeichnis

- Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN & Shuber AP (2000): Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 119(5): 1219–1227
- Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, Levin TR, Rex DK, Ahnen DJ, Knigge K, Lance MP, Burgart LJ, Hamilton SR, Allison JE, Lawson MJ, Devens ME, Harrington JJ & Hillman SL (2008): Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Ann. Intern. Med.* 149(7): 441–50, W81
- Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyrén P, Uhlén M & Lundeberg J (2000): Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal. Biochem.* 280(1): 103–110
- Atkin W (2003): Options for screening for colorectal cancer. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*(237): 13–16
- Bäumler S (2004): Entwicklung und Validierung von molekularen Markersystemen für QoL-Fungizidresistenzen bei pilzlichen Phytopathogenen, Technische Universität München
- Beach R, Chan AO, Wu T, White JA, Morris JS, Lunagomez S, Broaddus RR, Issa JJ, Hamilton SR & Rashid A (2005): BRAF mutations in aberrant crypt foci and hyperplastic polyposis. *Am. J. Pathol.* 166(4): 1069–1075
- Behn M, Thiede C, Neubauer A, Pankow W & Schuermann M (2000): Facilitated detection of oncogene mutations from exfoliated tissue material by a PNA-mediated 'enriched PCR' protocol. *J. Pathol.* 190(1): 69–75
- Berndt C, Haubold K, Wenger F, Brux B, Müller J, Bendzko P, Hillebrand T, Köttgen E & Zanow J (1998): K-ras mutations in stools and tissue samples from patients with malignant and nonmalignant pancreatic diseases. *Clin. Chem.* 44(10): 2103–2107
- Bi W & Stambrook PJ (1998): Detection of known mutation by proof-reading PCR. *Nucleic Acids Res.* 26(12): 3073–3075
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ & Vogelstein B (1987): Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327(6120): 293–297
- Breslauer KJ, Frank R, Blöcker H & Marky LA (1986): Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83(11): 3746–3750
- Brink M, Goeij AFPM de, Weijenberg MP, Roemen GMJM, Lentjes MHFM, Pachen MMM, Smits KM, Bruïne AP de, Goldbohm RA & van den Brandt PA (2003): K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 24(4): 703–710
- Calistri D, Rengucci C, Bocchini R, Saragoni L, Zoli W & Amadori D (2003): Fecal multiple molecular tests to detect colorectal cancer in stool. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 1(5): 377–383
- Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Lattuneddu A, Polifemo AM, Monti F, Saragoni L & Amadori D (2005): Mutation analysis of p53, K-ras, and BRAF genes in colorectal cancer progression. *J. Cell. Physiol.* 204(2): 484–488
- Chan TL, Zhao W, Leung SY & Yuen ST (2003): BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res.* 63(16): 4878–4881
- Chen C, Shiesh S & Wu S (2004): Rapid detection of K-ras mutations in bile by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping and melting curve analysis: comparison with restriction fragment length polymorphism analysis. *Clin. Chem.* 50(3): 481–489
- Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR & Steele RJC (2005): The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 54(9): 1283–1286
- Cotton PB, Durkalski VL, Pineau BC, Palesch YY, Mauldin PD, Hoffman B, Vining DJ, Small WC, Affronti J, Rex D, Kopecky KK, Ackerman S, Burdick JS, Brewington C, Turner MA, Zfass A, Wright AR, Iyer RB, Lynch P & Sivak MV et al (2004): Computed tomographic colonography (virtual

- colonoscopy): a multicenter comparison with standard colonoscopy for detection of colorectal neoplasia. *JAMA* 291(14): 1713–1719
- Dashwood RH, Suzui M, Nakagama H, Sugimura T & Nagao M (1998): High frequency of beta-catenin (ctnnb1) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. *Cancer Res.* 58(6): 1127–1129
- Deuter R & Müller O (1998): Detection of APC mutations in stool DNA of patients with colorectal cancer by HD-PCR. *Hum. Mutat.* 11(1): 84–89
- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW & Vogelstein B (2005): Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(45): 16368–16373
- Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, Kinzler KW & Vogelstein B (2008): Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* 135(2): 489–498
- Diergaarde B, van Geloof WL, van Muijen GNP, Kok FJ & Kampman E (2003): Dietary factors and the occurrence of truncating APC mutations in sporadic colon carcinomas: a Dutch population-based study. *Carcinogenesis* 24(2): 283–290
- Dominguez PL & Kolodney MS (2005): Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens. *Oncogene* 24(45): 6830–6834
- Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, Hibi K, Goodman SN, D'Allesio M, Paty P, Hamilton SR, Sidransky D, Barany F, Levin B, Shuber A, Kinzler KW, Vogelstein B & Jen J (2001): Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J. Natl. Cancer Inst.* 93(11): 858–865
- Ellis LA, Taylor GR, Banks R & Baumberg S (1994): MutS binding protects heteroduplex DNA from exonuclease digestion in vitro: a simple method for detecting mutations. *Nucleic Acids Res.* 22(13): 2710–2711
- Fearon ER & Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5): 759–767
- Fransén K, Klintenäs M, Osterström A, Dimberg J, Monstein H & Söderkvist P (2004): Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 25(4): 527–533
- Friedrich A & Kullmann F (2003): [Familial adenomatous polyposis syndrome (FAP): pathogenesis and molecular mechanisms]. *Med. Klin. (Munich)* 98(12): 776–782
- Fukushima H, Yamamoto H, Itoh F, Horiuchi S, Min Y, Iku S & Imai K (2001): Frequent alterations of the beta-catenin and TCF-4 genes, but not of the APC gene, in colon cancers with high-frequency microsatellite instability. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 20(4): 553–559
- Garnett MJ & Marais R (2004): Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 6(4): 313–319
- Gilje B, Heikkilä R, Oltedal S, Tjensvoll K & Nordgård O (2008): High-fidelity DNA polymerase enhances the sensitivity of a peptide nucleic acid clamp PCR assay for K-ras mutations. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 10(4): 325–331
- Hacia JG, Sun B, Hunt N, Edgemon K, Mosbrook D, Robbins C, Fodor SP, Tagle DA & Collins FS (1998): Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays. *Genome Res.* 8(12): 1245–1258
- Hancock DK, Schwarz FP, Song F, Wong LC & Levin BC (2002): Design and use of a peptide nucleic acid for detection of the heteroplasmic low-frequency mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) mutation in human mitochondrial DNA. *Clin. Chem.* 48(12): 2155–2163
- Hasegawa Y, Takeda S, Ichii S, Koizumi K, Maruyama M, Fujii A, Ohta H, Nakajima T, Okuda M & Baba S (1995): Detection of K-ras mutations in DNAs isolated from feces of patients with colorectal tumors by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Oncogene* 10(7): 1441–1445

- Haug U, Hundt S & Brenner H (2008): Sensitivity and specificity of faecal tumour M2 pyruvate kinase for detection of colorectal adenomas in a large screening study. *Br. J. Cancer* 99(1): 133–135
- Haug U, Hillebrand T, Bendzko P, Löw M, Rothenbacher D, Stegmaier C & Brenner H (2007): Mutant-enriched PCR and allele-specific hybridization reaction to detect K-ras mutations in stool DNA: high prevalence in a large sample of older adults. *Clin. Chem.* 53(4): 787–790
- Houlston RS, Collins A, Slack J & Morton NE (1992): Dominant genes for colorectal cancer are not rare. *Ann. Hum. Genet.* 56(Pt 2): 99–103
- Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA & Ross ME (2004): Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N. Engl. J. Med.* 351(26): 2704–2714
- Itabashi T, Maesawa C, Uchiyama M, Higuchi T & Masuda T (2004): Quantitative detection of mutant alleles of the K-ras gene with minor groove binder-conjugated fluorogenic DNA probes. *Int. J. Oncol.* 24(3): 687–696
- Jarry A, Masson D, Cassagnau E, Parois S, Laboisie C & Denis MG (2004): Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. *Mol. Cell. Probes* 18(5): 349–352
- Jass JR (2007): Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50(1): 113–130
- Jen J, Johnson C & Levin B (1998): Molecular approaches for colorectal cancer screening. *European journal of gastroenterology & hepatology* 10(3): 213–217
- Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B & Kinzler KW (1994): Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res.* 54(21): 5523–5526
- Kakiuchi H, Watanabe M, Ushijima T, Toyota M, Imai K, Weisburger JH, Sugimura T & Nagao M (1995): Specific 5'-GGGA-3'--5'-GGA-3' mutation of the Apc gene in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(3): 910–914
- Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Spring KJ, Wynter CVA, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR & Leggett BA (2004): BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 53(8): 1137–1144
- Kann L, Han J, Ahlquist D, Levin T, Rex D, Whitney D, Markowitz S & Shuber A (2006): Improved marker combination for detection of de novo genetic variation and aberrant DNA in colorectal neoplasia. *Clin. Chem.* 52(12): 2299–2302
- Kaur M, Zhang Y, Liu W, Tetradis S, Price BD & Makrigiorgos GM (2002): Ligation of a primer at a mutation: a method to detect low level mutations in DNA. *Mutagenesis* 17(5): 365–374
- Kwiatkowski RW, Lyamichev V, Arruda M de & Neri B (1999): Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay. *Mol. Diagn.* 4(4): 353–364
- Laurent-Puig P, Bérout C & Soussi T (1998): APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 26(1): 269–270
- Lay MJ & Wittwer CT (1997): Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin. Chem.* 43(12): 2262–2267
- Lichtenstein AV, Serdjuk OI, Sukhova TI, Melkonyan HS & Umansky SR (2001): Selective 'stencil'-aided pre-PCR cleavage of wild-type sequences as a novel approach to detection of mutant K-RAS. *Nucleic Acids Res.* 29(17): E90-0
- Lietman SA, Ding C & Levine MA (2005): A highly sensitive polymerase chain reaction method detects activating mutations of the GNAS gene in peripheral blood cells in McCune-Albright syndrome or isolated fibrous dysplasia. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 87(11): 2489–2494
- Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C & Sledziwski A (2008): DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin. Chem.* 54(2): 414–423

- Loganayagam A (2008): Faecal screening of colorectal cancer. *Int. J. Clin. Pract.* 62(3): 454–459
- Longacre TA & Fenoglio-Preiser CM (1990): Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.* 14(6): 524–537
- Lüchtenborg M, Weijenberg MP, Wark PA, Saritas AM, Roemen GMJM, van Muijen GNP, Bruïne AP de, van den Brandt PA & Goeij AFPM de (2005): Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer* 5([Heftnummer fehlt!]): 160
- Luo J, Chan E, Shih C, Chen T, Liang Y, Hwang T & Chiou C (2006): Detection of rare mutant K-ras DNA in a single-tube reaction using peptide nucleic acid as both PCR clamp and sensor probe. *Nucleic Acids Res.* 34(2): e12
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B & Kinzler KW (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275(5307): 1787–1790
- Mouritzen P, Nielsen AT, Pfundheller HM, Choleva Y, Kongsbak L & Møller S (2003): Single nucleotide polymorphism genotyping using locked nucleic acid (LNA). *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3(1): 27–38
- Nagai Y, Miyazawa H, Huqun, Tanaka T, Udagawa K, Kato M, Fukuyama S, Yokote A, Kobayashi K, Kanazawa M & Hagiwara K (2005): Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res.* 65(16): 7276–7282
- Oldenburg RP, Liu MS & Kolodney MS (2008): Selective amplification of rare mutations using locked nucleic acid oligonucleotides that competitively inhibit primer binding to wild-type DNA. *J. Invest. Dermatol.* 128(2): 398–402
- Orum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O & Stanley C (1993): Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res.* 21(23): 5332–5336
- Osborn NK & Ahlquist DA (2005): Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches. *Gastroenterology* 128(1): 192–206
- Pollock PM & Meltzer PS (2002): Lucky draw in the gene raffle. *Nature* 417(6892): 906–907
- Potter JD (1997) Food, nutrition and the prevention of cancer: A global perspective, Washington, DC, Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B & Kinzler KW (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359(6392): 235–237
- Prix L, Uciechowski P, Böckmann B, Giesing M & Schuetz AJ (2002): Diagnostic biochip array for fast and sensitive detection of K-ras mutations in stool. *Clin. Chem.* 48(3): 428–435
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B & Velculescu VE (2002): Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418(6901): 934
- Ratto C, Flamini G, Sofo L, Nucera P, Ippoliti M, Curigliano G, Ferretti G, Sgambato A, Merico M, Doglietto GB, Cittadini A & Crucitti F (1996): Detection of oncogene mutation from neoplastic colonic cells exfoliated in feces. *Dis. Colon Rectum* 39(11): 1238–1244
- Rhodes CH, Honsinger C, Porter DM & Sorenson GD (1997): Analysis of the allele-specific PCR method for the detection of neoplastic disease. *Diagn. Mol. Pathol.* 6(1): 49–57
- Ross P, Hall L, Smirnov I & Haff L (1998): High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 16(13): 1347–1351
- Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF & Tomlinson IP (2000): APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(7): 3352–3357
- Sambrook J & Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74(12): 5463–5467

Senescau A, Berry A, Benoit-Vical F, Landt O, Fabre R, Lelièvre J, Cassaing S & Magnaval J (2005): Use of a locked-nucleic-acid oligomer in the clamped-probe assay for detection of a minority Pfcrt K76T mutant population of *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Microbiol.* 43(7): 3304–3308

Seyama T, Ito T, Hayashi T, Mizuno T, Nakamura N & Akiyama M (1992): A novel blocker-PCR method for detection of rare mutant alleles in the presence of an excess amount of normal DNA. *Nucleic Acids Res.* 20(10): 2493–2496

Shi MM (2001): Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin. Chem.* 47(2): 164–172

Silahtaroglu A, Pfundheller H, Koshkin A, Tommerup N & Kauppinen S (2004): LNA-modified oligonucleotides are highly efficient as FISH probes. *Cytogenet. Genome Res.* 107(1-2): 32–37

Singh SK & Wengel J: Universality of LNA-mediated high-affinity nucleic acid recognition. *Chem. Commun.* 1998: 1247–1248

Smith-Ravin J, England J, Talbot IC & Bodmer W (1995): Detection of c-Ki-ras mutations in faecal samples from sporadic colorectal cancer patients. *Gut* 36(1): 81–86

Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B & Kinzler KW (1998): Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58(6): 1130–1134

Steinberg P & Scholtka B (2004): Method for conducting non-invasive early detection of colon cancer and/or of colon cancer precursor cells. *Patentschrift*

Sugimoto N, Nakano S, Yoneyama M & Honda K (1996): Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* 24(22): 4501–4505

Syvänen AC (2001): Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.* 2(12): 930–942

Syvänen AC, Aalto-Setälä K, Harju L, Kontula K & Söderlund H (1991): A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics* 8(4): 684–692

Thiede C, Bayerdörffer E, Blasczyk R, Wittig B & Neubauer A (1996): Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping. *Nucleic Acids Res.* 24(5): 983–984

Tibble J, Sigthorsson G, Foster R, Sherwood R, Fagerhol M & Bjarnason I (2001): Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma. *Gut* 49(3): 402–408

Traverso G, Shuber A, Levin B, Johnson C, Olsson L, Schoetz DJ, Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW & Vogelstein B (2002): Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N. Engl. J. Med.* 346(5): 311–320

Tsukamoto T, Tanaka H, Fukami H, Inoue M, Takahashi M, Wakabayashi K & Tatematsu M (2000): More frequent beta-catenin gene mutations in adenomas than in aberrant crypt foci or adenocarcinomas in the large intestines of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-treated rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 91(8): 792–796

Turner DJ, Zirvi MA, Barany F, Elenitsas R & Seykora J (2005): Detection of the BRAF V600E mutation in melanocytic lesions using the ligase detection reaction. *J. Cutan. Pathol.* 32(5): 334–339

van Den Bosch BJ, Coo RF de, Scholte HR, Nijland JG, van Den Bogaard R, Visser M de, Die-Smulders CE de & Smeets HJ (2000): Mutation analysis of the entire mitochondrial genome using denaturing high performance liquid chromatography. *Nucleic Acids Res.* 28(20): E89

Villa E, Dugani A, Rebecchi AM, Vignoli A, Grottola A, Buttafoco P, Losi L, Perini M, Trande P, Merighi A, Lerosé R & Manenti F (1996): Identification of subjects at risk for colorectal carcinoma through a test based on K-ras determination in the stool. *Gastroenterology* 110(5): 1346–1353

Vogelstein B & Kinzler KW (1999): Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(16): 9236–9241

Vogelstein B & Kinzler KW (2004): Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10(8):

789–799

Wang J, Hsieh J, Chang M, Huang T, Chen F, Cheng T, Alexandersen K, Huang Y, Tzou W & Lin S (2004):Molecular detection of APC, K- ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World journal of surgery* 28(7): 721–726

Wegmüller B, Lüthy J & Candrian U (1995):3'-5' proofreading-induced detection of point mutations by PCR using Tli DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 23(2): 311–312

Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR & Büchler MW (2005):Colorectal cancer. *Lancet* 365(9454): 153–165

Whitney D, Skoletsky J, Moore K, Boynton K, Kann L, Brand R, Syngal S, Lawson M & Shuber A (2004):Enhanced retrieval of DNA from human fecal samples results in improved performance of colorectal cancer screening test. *The Journal of molecular diagnostics* : JMD 6(4): 386–395

Xiao W & Oefner PJ (2001):Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum. Mutat.* 17(6): 439–474

Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O & O'Brien MJ (2004):BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *Am. J. Surg. Pathol.* 28(11): 1452–1459

You Y, Moreira BG, Behlke MA & Owczarzy R (2006):Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res.* 34(8): e60

## 9 Anhang

### 9.1 Geräte

Analysenwaage ALJ 220-4NM	Kern & Sohn GmbH
Brutschrank OV1	Biometra GmbH
Geldokumentationseinheit E.A.S.Y Win32	Herolab GmbH
Gelelektrophoresekammer	Biozym
Inkubations-Schüttler <i>CERTOMAT.®. BS-T</i>	Sartorius
LightCycler instrument 2.0	Roche Diagnostics GmbH
Mastercycler® ep <i>realplex</i>	Eppendorf AG
Pipetten	Eppendorf AG
Spannungsgeber (Gelelektrophorese) EPS310	Amersham Pharmacia Biotech
Spektrophotometers Ultrospec 4000	Amersham Pharmacia Biotech
Thermocycler GeneAmp 9700	PerkinElmer
Thermomixer S436	Eppendorf AG
Vortex-Shaker <i>Reax 2000</i>	Heidolph Instruments GmbH
Waage 440-33N	Kern & Sohn GmbH

### 9.2 Chemikalien

Agarose	Biozym
Ethidiumbromid	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich
BSA	Roche Diagnostics GmbH
EDTA	Sigma-Aldrich

### 9.3 Puffer und Lösungen

Gelladepuffer	0,25 % (w/w) Bromphenolblau [Merck] 0,25 % (w/w) Xylencyanol FF [Sigma-Aldrich] 30,0 % (w/w) Glycerin [Roth]
1 x TBE-Puffer	90 mM Tris-Borat 2,0 mM EDTA, pH=8,3 bei 25 °C [Merck]
LB-Medium	10,0 g/l Pepton [Merck] 5,0 g/l Hefeextrakt [Merck] 5,0 g/l NaCl [Merck] 0,1 g/l Ampicillin [Roth]
LB/IPTG/X-Gal/Amp Agarplatten	10,0 g/l Pepton [Merck] 5,0 g/l Hefeextrakt [Merck] 5,0 g/l NaCl [Merck] 0,1 g/l Ampicillin [Roth] 0,08 g/l X-Gal [Roth] 0,5 mM IPTG [Roth] 15,0 g/l Agar-Agar[Roth]
SOC-Medium	0,2 g/l Trypton [Merck] 0,05 g/l Hefeextrakt [Merck]

	10,0 mM NaCl [Merck]
	2,5 mM KCl[Merck]
	2,0 mM Glucose [Merck]
	10,0 mM MgCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O [Sigma-Aldrich]
	10,0 mM MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O [Sigma-Aldrich]
HSTE	0.01M Tris HCl [Sigma-Aldrich]
	0.5 mM EDTA [Sigma-Aldrich]
	0.01 mg/ml Salmon Sperm DNA [Sigma-Aldrich]

## 9.4 Enzyme und Molekularbiologische Reagenzien

DNA-Längenstandard 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs
FastStart <i>Taq</i> DNA-Polymerase & 10 x Puffer	Roche Diagnostics GmbH
Klein- <i>Taq</i> DNA Polymerase & 10-Puffer	Bioron
Diamond DNA Polymerase & NH <sub>4</sub> -Puffer	Bioline
dNTPs	Roche Diagnostics GmbH
Primer	MWG-Biotech AG
Hybridisierungssonden	Biomers GmbH
LNA-Oligonukleotide	Thermo Fisher Scientific GmbH
SYBR®-Green I	Molecular Probes
Quant-iT™ PicoGreenR dsDNA Assay Kit	Invitrogen
TAQ DNA Ligase & Ligasereaction buffer	New England Biolabs
Restriktionsenzym <i>SacI</i> & 10 x NEBuffer 1	New England Biolabs
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics GmbH
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAprep Miniprep Kit	QIAGEN
pGEM®-T Vector Kit	Promega
<i>E. coli</i> XL-1 Blue Zellen	Stratagene

## 9.5 Abkürzungsverzeichnis

6-FAM	6-carboxyfluorescein
A	Adenin
APC	adenomatous polyposis coli
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CT	Cycle treshold, auch crossing point (CP)
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat; (dATP, dCTP, dGTP und dTTP und/oder dUTP)
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	et alii (und andere)
FAM	Fluoreszenz-Farbstoff
FOBT	faecal occult blood test
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Guanin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSTE	salmonsperm DNA plus Tris-EDTA Puffer
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
LNA	Locked nucleic acid
MAP	microtubule associated protein
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNA	Peptide nucleic acid
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rox	Fluoreszenz-Farbstoff
s	Sekunde
<i>SNP</i>	Single nucleotide polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Pablo Steinberg für die Vergabe des interessanten Themas, den ständigen wissenschaftlichen Austausch während der Experimentierphase und die gründliche Korrektur des Manuskripts. Insbesondere danke ich ihm für die Bereitschaft, die Betreuung auch in seiner neuen Position als Direktor des Instituts für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik an der Tierärztlichen Hochschule Hannover und trotz der Verzögerung durch die Geburt meiner beiden Söhne fortzusetzen.

Frau Dipl.-Ing. Dr. Kornelia Berghof-Jäger danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit bei der Firma Bioteccon Diagnostics GmbH anzufertigen. Ich danke ihr für das große Interesse an den Ergebnissen und der Bereitschaft zum wissenschaftlichen Austausch.

Ganz besonders danke ich meinem Ehemann Dr. Christoph Schatz für die große Geduld und die konstruktive und umfassende Kritik und bei der Entstehung des Manuskripts.

Hanna Hartenstein danke ich für fachliche Gespräche und Anregungen während der Anfertigung der schriftlichen Arbeit und für das kritische Korrekturlesen des Manuskripts.

Dr. Mandy Schneider und Dr. Bettina Scholtka danke ich für die nette Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Daten der Mutationsanalysen, den wissenschaftlichen Austausch und universitätsorganisatorische Unterstützung.

Den Mitarbeitern von Bioteccon Diagnostics danke ich für die schöne Zeit in der Firma und die angenehme Arbeitsatmosphäre.