



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Etablierung eines Diagnostikverfahrens zur Ermittlung der V600E B-Raf-Mutation in Humanproben und Aufstellen einer Statistik, der den Zusammenhang zwischen benignen Hirntumoren und B-Raf-Mutationen zeigt.

Bachelorarbeit im Studiengang Biotechnologie der Fakultät Life Sciences

Vorgelegt von
Farah Rahman

Matrikelnummer: 2023817
Datum: 3. Juni 2014

Interner Gutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (Haw Hamburg)
Externer Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Glatzel (UKE Hamburg)

Die Abschlussarbeit wurde erstellt und betreut im Labor des Instituts für Neuropathologie

Inhaltverzeichnis

Dankesagung.....	4
Eidesstattliche Erklärung.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	8
1.1. Institut der Neuropathologie.....	8
1.2. Zielsetzung dieser Abschlussarbeit.....	9
2. Theorie.....	11
2.1. Hirntumore Allgemein.....	11
2.2. Gliome.....	12
2.3. BRAF-Mutation.....	15
2.4. Mitogen-Activated-Protein-Kinases(MAPK)-Signalweg.....	16
3. Material und Methoden.....	18
3.1. Allgemeine Materialien.....	18
3.2. DNA-Isolierung aus Humanproben.....	18
3.2.1. Gewebepräparation.....	18
3.2.2. Isolierung des Gewebes aus dem Paraffinbett.....	19
3.2.3. Gewebeverdau.....	20
3.2.4. DNA-Extraktion.....	21
3.2.5. DNA-Fällung.....	21
3.2.6. DNA-Lösung.....	22
3.3. DNA-Konzentrationsbestimmung.....	23
3.4. Polymerase Chain Reaction.....	23
3.5. Gelelektrophorese.....	28
3.6. Ethidiumbromid-Färbung.....	30
3.7. DNA-Sequenzierung.....	30
4. Ergebnisse.....	31
4.1. Optimierung des Pipettierschemas der PCR.....	31
4.2. Optimierung der Primer-Zugabe.....	31
4.3. Optimierung der Primer-Annealing-Temperatur.....	33
4.4. Optimierung der PCR-Durchführung.....	37
4.5. Optimierung der Analyse der PCR-Produkte.....	38
4.6. Optimierung der Analyse von Proben mit geringer DNA-Konzentration.....	38
4.7. Statistische Analyse.....	39

5. Zusammenfassung und Ergebnisdiskussion.....	44
6. Ausblick.....	46
7. Referenzen.....	48
8. Anhänge.....	50

Dankesagung

Die vorliegende Bachelorarbeit entstand in dem Hamburger Universitätsklinikum Eppendorf im Institut für Neuropathologie. Für die Möglichkeit diese Arbeit durchzuführen möchte ich mich beim Institut für Neuropathologie herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt dabei an Herr Prof. Dr. Glatzel für die hervorragende fachliche Betreuung dieser Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachters.

Ein weiterer Dank gilt an Frau B. Szalay, die mich hervorragend technisch betreut hat und immer ein offenes Ohr hatte.

Herr Prof. Dr. Wacker danke ich für die Betreuung seitens der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei allen, die mich in der Zeit meiner Abschlussarbeit unterstützt haben, ganz besonders bei meinen Eltern, die mir stets helfend zur Seite gestanden und mein Studium erleichtert haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, den 3. Juni 2014

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung Beschreibung

%	<i>Prozent</i>
A	<i>Adenin</i>
ARMS	<i>Amplification Refractory Mutation System</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
BRAF	<i>B-Raf-Protein</i>
Bsp.	<i>Beispielsweise</i>
Bzw.	<i>Beziehungsweise</i>
C	<i>Cytosin</i>
°C	<i>Grad Celsius</i>
Ca.	<i>Circa</i>
Ca²⁺	<i>Kalzium-2+-Ionen</i>
cm	<i>Zentimeter</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP	<i>Nukleotid</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure/ Ethylendiamintetraacetat</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
Fo	<i>Forward Primer</i>
F1	<i>Forward Primer</i>
Fiwt	<i>Forward Primer</i>
G	<i>Guanin</i>
Glu	<i>Glutamin</i>
h	<i>Stunde</i>
µg	<i>Mikrogramm</i>
µL	<i>Mikroliter</i>
µm	<i>Mikrometer</i>
M	<i>Molare Masse</i>
M1	<i>Marker 1</i>
M2	<i>Marker 2</i>
mA	<i>Milliamper</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
MEK1/2	<i><u>MAPK</u>/<u>ERK</u> Kinase 1/2</i>
mg	<i>Milligramm</i>
Min.	<i>Minute</i>
mL	<i>Milliliter</i>
mm	<i>Millimeter</i>
mM	<i>Millimol</i>
Mut	<i>Mutant</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
Neg	<i>Negativ-Kontrolle</i>
ng	<i>Nanogramm</i>
nm	<i>Nanometer</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pos	<i>Positiv-Kontrolle</i>
Ro	<i>Revers Primer</i>

R1	<i>Revers Primer</i>
Rimut	<i>Revers Primer</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
s	<i>Sekunde</i>
T	<i>Thymin</i>
Thr	<i>Threonin</i>
Tyr	<i>Tyrosin</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>
V	<i>Volt</i>
WHO	<i>Weltgesundheitsorganisation</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

1. Einleitung

Im folgenden Kapitel erfolgt eine Einführung zu dem Institut, in der die Arbeit durchgeführt wurde und anschließend erhält der Leser die Zielsetzung der Arbeit in Schriftform und anhand einer Grafik.

1.1. Institut für Neuropathologie

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Neuropathologie im Universitätsklinikum Eppendorf in der Abteilung Forschung angefertigt.

Das Institut für Neuropathologie ist Teil des Diagnostikzentrums und beschäftigt sich einerseits mit der Diagnostik von Krankheiten des zentralen und peripheren Nervensystems und der Muskulatur. Zum anderen werden grundlegende Zusammenhänge der Neurodegeneration und der Krankheitsentstehung im Nervensystem erforscht. [1]

Am Institut für Neuropathologie gibt es drei Forschungsschwerpunkte. Die Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen, die durch pathologische Proteinablagerungen im Gehirn hervorgerufen werden (Prionenerkrankungen, Alzheimersche Erkrankung, familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlüssen) stellt den ersten Forschungsschwerpunkt dar. Als zweites steht die Neuroonkologie (genetische Veränderungen und Immunbiologie von Hirntumoren, Neuropathologie der Neurofibromatose) im Mittelpunkt. Auch in der Stammzellforschung wird geforscht. [2]

Für die Arbeit wurde in den Laboren des Forschungszentrums gearbeitet. Das Thema der Arbeit hat einen Bezug zur Neuroonkologie.

1.2. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll ein Verfahren etabliert werden, das es ermöglicht, in der Zukunft auf Basis einfacher Labormethoden eine V600E-*BRAF*-Mutation bei Patientenproben nachzuweisen. Die Analyse von V600E-*BRAF*-Mutationen stellt eine wichtige Voraussetzung für die Auswahl einer geeigneten Therapie bei Patienten mit Hirntumoren dar und soll demnach als Diagnose-Verfahren im Universitätsklinikum Eppendorf zum Einsatz kommen.

Dafür wurde das Verfahren, das in der Publikation [8] „Sensitive detection of *BRAF* V600E mutation by Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR“ von Huang, Zhuge und Zhang aus dem Jahr 2013 beschrieben ist, angewandt und optimiert. Dabei wurden in Paraffin-eingebettete Humanproben nach Vorgaben des Institutes soweit vorbereitet, dass die genomische DNA in wässriger Lösung vorliegt. Anschließend erfolgte eine mutationsspezifische und eine wildtypspezifische PCR. Die PCR-Bedingungen wurden zum Teil aus der Publikation übernommen, aber auch Optimierungsversuche für die spätere routinemäßige Analyse sind gestartet worden. Für die Auswertung ist der PCR noch eine Gelelektrophorese mit anschließender Gelfärbung nachgeschaltet.

Ein zweites Ziel dieser Arbeit ist die Aufstellung einer Statistik, die den Zusammenhang zwischen an pilozytischer Astrozytome – erkrankten Patienten und einer möglichen *BRAF*-Mutation wiedergibt. Dafür wurden an Patientenproben, bei denen bereits ein Hirntumor festgestellt wurde, eine Mutationsanalyse für *BRAF* durchgeführt. Die Proben wurden wie im vorherigen Abschnitt methodisch behandelt und es ist somit eine Statistik entstanden.

In der unten stehenden Abbildung ist der Arbeitsablauf für die etablierte Diagnostik-Methode dargestellt. Die genauen Methoden sind in *Abschnitt 3* erläutert, die *Abbildung 1* soll nur für einen Überblick sorgen.

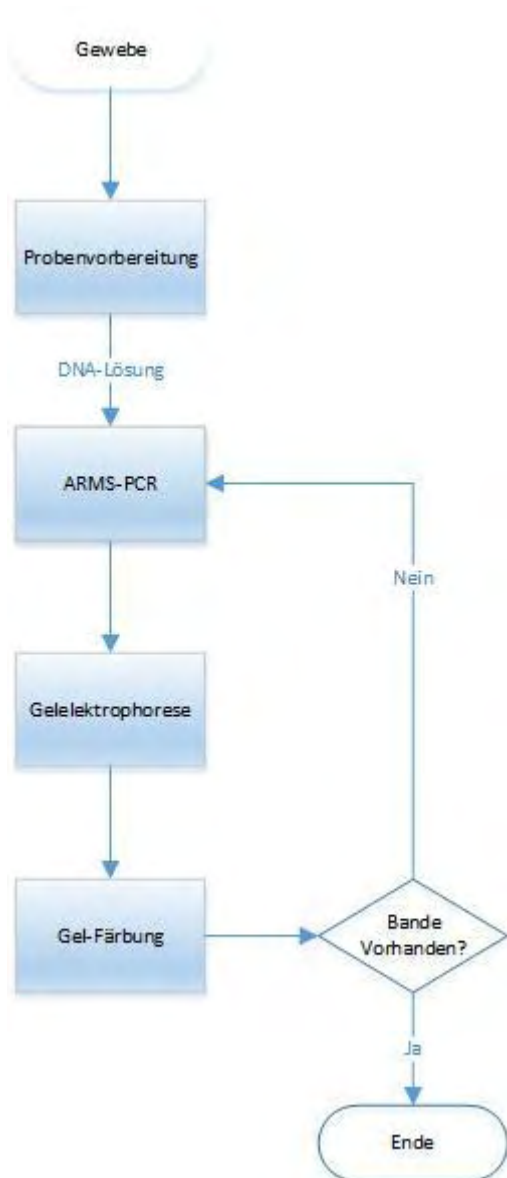


Abbildung 1: In der Abbildung ist das etablierte Verfahren mit den jeweiligen Schritten dargestellt. Die Proben durchlaufen eine Probenvorbereitung, bei der die genomische DNA aus dem Gewebe isoliert wird. Mit der gewonnenen DNA können die PCR-Durchläufe und anschließend eine Gelelektrophorese gestartet werden. Sollten auf dem Gel keine spezifischen Banden der entsprechenden Größe vorhanden sein, wird die PCR solange optimiert, das heißt verschiedene Parameter solange verändert, bis die zu erwartende Bande entsteht. Sobald die Bande vorhanden ist, sind die PCR-Bedingungen für dieses Verfahren optimiert.

Bei der Entwicklung des Verfahrens sollen zwei wichtige Ziele betrachtet werden. Zum einen muss bei der Anwendung des Verfahrens immer ein klares Ergebnis rauskommen, beispielsweise soll auf dem Gel eine einzelne PCR-Bande der entsprechenden Produktgröße analysiert werden. Zum anderen soll das Verfahren mit den üblichen Laborgeräten und Labormaterialien durchführbar sein. Auf dem Markt gibt es beispielsweise für die V600E-*BRAF*-Mutation spezifische Antikörper. Diese Antikörper sind aber sehr teuer und in der Handhabung sehr aufwendig. Da das Verfahren später dann als routinemäßige Arbeit eingesetzt wird, soll es so einfach wie möglich mit den üblichen Laborutensilien angewendet werden können. Mit einer PCR und anschließender Gelelektrophorese ist man sowohl zeitlich und methodisch im Vorteil, aber auch der Kostenfaktor ist im Vergleich zu anderen Methoden geringer.

2. Theorie

2.1. Hirntumore Allgemein

Unter Hirntumoren werden alle innerhalb des Schädels liegenden Neoplasien des Zentralnervensystems zusammengefasst. Sie zeigen eine enorme histologische und zytologische Variationsbreite. Die WHO-Klassifikation differenziert mehr als 120 Subtypen, deren Beschreibung von Zellen des embryonalen und adulten Gehirns abgeleitet ist. [2]

Einige der genetischen Veränderungen können bei fast allen Hirntumoren auftreten. Andere sind spezifisch für bestimmte Tumorentitäten. Die phänotypischen Unterschiede der einzelnen Hirntumoren beruhen offenbar zusätzlich auf unterschiedlichen Genexpressionsmustern der betreffenden Matrixzellen, aber auch auf unterschiedlichen überwiegend noch nicht erforschten zusätzlichen genetischen Veränderungen. [2]

Hirntumoren sind vergleichsweise selten. Sie liegen in Deutschland bei den Frauen mit 3,7 % auf dem 10. Platz und bei den Männern mit 2,7 % auf dem 14. Platz der gesamten Tumorinzidenz. [2]

Hirntumore lassen sich sowohl in gutartige und als auch bösartige Neoplasien im Gehirn unterteilen, wobei etwa 70 % aller Hirntumore als gutartig bewertet werden und 30 % als bösartig eingestuft werden. Manche treten typischerweise im Kindesalter, andere in höherem Alter auf. [3]

Die vielfältigen Hirntumore werden nach dem Kriterium des Ursprungs voneinander abgegrenzt. Denn im Hirn befinden sich viele verschiedene Zelltypen, die entarten können. Am häufigsten gehen Hirntumore von den sogenannten Gliazellen, das sind Stützzellen im Gehirn, aus. Zu diesen als Gliome bezeichneten Krebsarten zählen Astrozytome, Oligoendogliome und Ependymome, aber auch die Glioblastome, die die bösartigste Form der Gliome darstellen. [3]

2.2. Gliome

Die Nervenzellen sind im Allgemeinen soweit spezialisiert, dass sie die Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben. Sie sind daher selten der Ursprung von Tumoren. Allerdings besteht das Gehirn nicht nur aus Nervenzellen, sondern zu einem Großteil aus Gliazellen, die als Hirnstützsubstanz bezeichnet werden. Die Tumoren, die sich aus den Zellen der Glia entwickeln, nennt man Gliome. [4]

Gliome machen etwa 60 % der Hirntumore aus und kommen überwiegend bei Erwachsenen vor, Kinder können jedoch auch an Gliomen erkranken. Da man im gesunden Gehirn spezialisierte Gliazellen mit exakt umschriebenen Funktionen findet - Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymozyten - bezeichnet man die Gliome heutzutage nach dem Zelltyp, von dem sie ursprünglich abstammen. Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome sind die exakten Tumorbezeichnungen für die jeweiligen Tumorarten. Als Glioblastome bezeichnet man Gliome, die keiner Zellform mehr ähneln, da sie aus stark entarteten Tumorzellen bestehen. [4]

Das häufigste Gliom ist das Glioblastom (50 %), gefolgt vom Astrozytom (ca. 30 %), Oligodendrogliom (ca. 8 %) und Ependymom (ca. 6 %). [4]

<u>Typ von Gliazellen</u>	<u>Beschreibung</u>
<i>Astrozyt</i>	Sternförmig verzweigte Zellen, deren Fortsätze Grenzmembranen zur Gehirnoberfläche und zu den Blutgefäßen bilden <ul style="list-style-type: none"> - Sind maßgeblich an der Flüssigkeitsregulation im Gehirn beteiligt - Sorgen für die Aufrechterhaltung des Kalium-Haushaltes
<i>Oligodendrozyt</i>	Myelinzellen, die Axone umhüllen und somit die Reizleitungs-Geschwindigkeit steigern
<i>Ependymozyt</i>	Einlagige Zellschicht, die Flüssigkeitsräume des Zentralnervensystems vom restlichen Gewebe trennt (z.B. Liquor)

Tabelle 1: Darstellung der verschiedenen Gliazell-Typen und Beschreibung ihres Erscheinens und ihrer Hauptfunktionen

Die Einteilungskriterien aller Tumore des Nervengewebes wurden das letzte Mal im Jahr 2007 von einem Expertengremium der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgestellt. Die Tumore werden in verschiedene Grade eingeteilt, die angeben, ob es sich um langsam- oder schnellwachsende Tumore handelt. Tumore mit den WHO-Graden 1 und 2 wachsen langsamer, während mit den WHO-Graden 3 und 4 schneller wachsen. [4]

Da für diese Arbeit hauptsächlich die Astrozytome eine wichtige Rolle spielen, wird daher der Fokus auf die astrozytären Gliome gelegt. Die astrozytären Gliome sind mit einem Anteil von ca. 70% die häufigsten Gliome und lassen sich in die vier unten aufgeführten Hauptgruppen unterteilen. [2]

<u>Astrozytäre Gliome</u>	
• <u>Pilozystisches Astrozytom</u>	WHO Grad 1
• <u>Diffuses Astrozytom</u>	WHO Grad 2
• <u>Anaplastisches Astrozytom</u>	WHO Grad 3
• <u>Glioblastom</u>	WHO Grad 4

Abbildung 2: Arten der astrozytären Gliome und ihre Grad-Einstufung

Das Glioblastom ist der häufigste und bösartigste astrozytäre Tumor. Glioblastome machen mehr als die Hälfte aller Gliome aus und treten bevorzugt im Großhirn bei Erwachsenen auf. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr. Die meisten Glioblastome entstehen mit kurzer klinischer Vorgeschichte (primäre Glioblastome). Glioblastome, die sich aus einem vorbestehenden, diffusen oder anaplastischen Astrozytom entwickeln, bezeichnet man als sekundäre Glioblastome. [5]

Anaplastische Astrozytome sind eher histologisch und durch eine quantitative Zunahme der genetischen Veränderungen, z.B. Allelverluste auf 19q als durch weitere definierte qualitative Veränderungen von den niedriggradigen Astrozytomen abzugrenzen. [2] Diese Tumoren zeigen feingewebliche Merkmale der Bösartigkeit, die für ein rasches Tumorwachstum sprechen. Anaplastische Astrozytome können entweder aus einem vorbestehenden diffusen Astrozytom hervorgehen oder unmittelbar neu entstehen. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr. [5]

Diffuse Astrozytome (Grad II) sind durch p53-Mutationen bzw. -Deletionen bei sonst ebenfalls seltenen und überwiegend unsystematischen Veränderungen gekennzeichnet. [2] Hierbei handelt es um ein feingeweblich ebenfalls gut differenziertes astrozytäres Gliom, das langsam und ohne scharfe Grenze zum angrenzenden Hirngewebe wächst. Diffuse Astrozytome machen 10-15% der astrozytären Gliome aus und treten vorzugsweise bei jungen Erwachsenen auf (Altersgipfel: 30. bis 40. Lebensjahr). Es besteht eine Neigung zum Übergang in ein anaplastisches Astrozytom oder ein Glioblastom. [5]

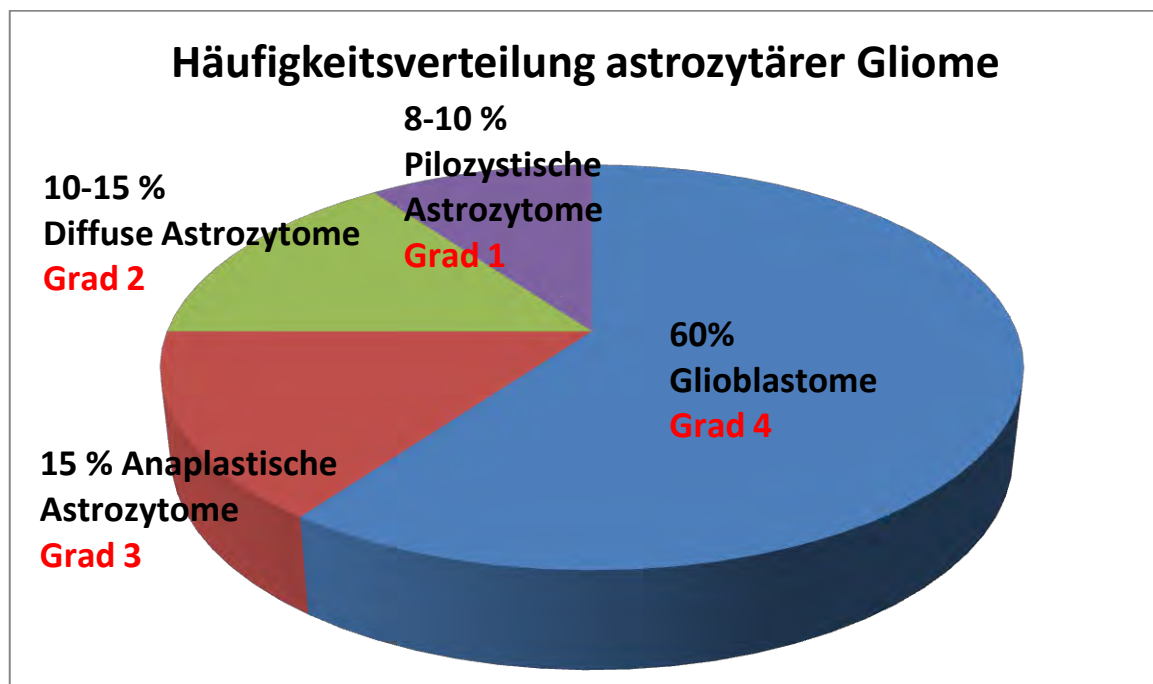


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung astrozytärer Gliome

Pilozytische Astrozytome (Grad I) zeigen zytogenetisch, aber auch molekulargenetisch, nur wenige und überwiegend uneinheitliche Veränderungen. [2] Es handelt sich um einen langsam und umschrieben wachsenden, feingeweblich gut differenzierten Tumor mit günstiger Prognose. Pilozytische Astrozytome sind die häufigsten Gehirntumoren des Kindesalters. [5] Die überwiegende Mehrheit der pilozytischen Astrozytome des Kindesalters ist durch Genduplikationen und Fusionen

von B-Raf mit anderen Genen gekennzeichnet (60-90%). Seltener findet sich die aktivierende Punktmutation B-Raf-V600E (10-15%). [6]

Für diese Arbeit soll eine kleine Statistik aufgestellt werden, die beschreibt, wie viele Patienten, die an pilozytischer Astrozytome leiden, zudem noch eine *BRAF-V600E*-Mutation aufweisen.

2.3. *BRAF*-Mutation

Das *BRAF*-Gen kodiert für das Protein Serine/Threonin-Protein Kinase *BRAF*, welches bei der Regulation des MAPK/ERK Signalwegs eine Rolle spielt und u.a. Zellteilung und Differenzierung beeinflusst. Mutationen im *BRAF*-Gen können zu einer Daueraktivierung dieses Signalwegs führen und so zur Krebsentstehung beitragen. Mutationen im *BRAF*-Gen sind bei verschiedenen Tumoren beschrieben worden, z.B. beim malignen Melanom (50-70%), Kolorektalen Karzinom (5-15%), serösen Ovarialkarzinom (5-100%), papillärem Schilddrüsenkarzinom (40-70%). Bei glialen Hirntumoren kommen *BRAF*-Mutationen in ca. 8% der Fälle vor, wobei über 80 % das Codon V600 in Exon 15 betreffen (V600E-Mutation). [7] [8]

Bei der V600E-Mutation handelt es sich um eine Punktmutation, das heißt es kommt zum Austausch einer Base in der DNA-Sequenz. Der Austausch der Base Thymin gegen Adenin im Codon 600 führt zur Substitution von Valin gegen Glutaminsäure an 600-ster Stelle der Aminosäuren-Sequenz. Diese Mutation liegt in der Kinaseaktivitätsdomäne des Proteins. Ungefähr 80-90 % der *BRAF*-Mutationen sind V600E-Mutationen. [9]

Neuerdings sind spezifische *BRAF*-Inhibitoren als Medikamente gegen Tumore mit nachgewiesener *BRAF-V600* Mutation in klinischer Erprobung. So konnte kürzlich in einer Studie zum malignen Melanom gezeigt werden, dass spezifische *BRAF*-Inhibitoren die Überlebenszeit beim malignen Melanom signifikant verlängern können. Durch *BRAF*-Inhibition kann in den Melanomzellen gezielt Apoptose (programmierter Zelltod, „Selbstmordprogramm einer Zelle“) induziert werden. Vemurafenib ist beispielsweise ein selektiver Inhibitor des Onkogens *BRAF*. Der Wirkungsmechanismus ist die Inhibition von mutiertem *BRAF* und zeigt somit keinen Einfluss gegen Zellen mit *BRAF*-Wildtyp. Vemurafenib ist ein oral einzunehmendes Medikament und gehört zur Wirkstoffgruppe der Zytostatika. Eine Therapie mit Vemurafenib zeigt einen Überlebensvorteil verglichen mit einer konventionellen Chemotherapie. [7]

Um eine gezielte Therapie starten zu können, ist die Bestimmung des *BRAF-V600* Mutationsstatus hilfreich. Auf dem Markt sind sogar spezielle V600E-Mutationstestkits. Sobald eine *BRAF*-Mutation vorliegt, kann der Patient von einer Therapie mit *BRAF*-Inhibitoren profitieren. Die *BRAF*-Mutationsanalyse stellt somit einen wichtigen Grundbaustein für die Auswahl der Therapie für Patienten mit Hirntumoren dar und soll anhand dieser Abschlussarbeit etabliert werden.

2.4. Mitogen-Activated-Protein-Kinases (MAPK)-Signalweg

Der MAPK (mitogen-activated-protein-kinases) /ERK (extracellular signal-regulated kinase) -Signalweg stellt eine Signalkette bestehend aus mehreren Proteinen dar, die ein Signal außerhalb der Zelle ins Zellinnere bringt. Das Signal beginnt mit der Bindung eines Signalmoleküls am Rezeptor der Zellmembran und endet mit der Expression von Wachstumsproteinen und der Veränderung der Zelle insgesamt. Sie wird teilungsfähiger. Der Signalweg beinhaltet viele verschiedene Proteine, die MAPK-Proteine (mitogen-activated protein kinases), welche hauptsächlich die Eigenschaft haben, Phosphatgruppen an benachbarte Proteine anzufügen und die Proteine somit zu aktivieren. Sollte ein Protein in der Signalkette mutiert sein, kann die Signalkette permanent eingeschaltet sein und somit Zellwachstum ständig gefördert werden. Dies führt in den meisten Fällen zur Entwicklung von Tumoren. [10]

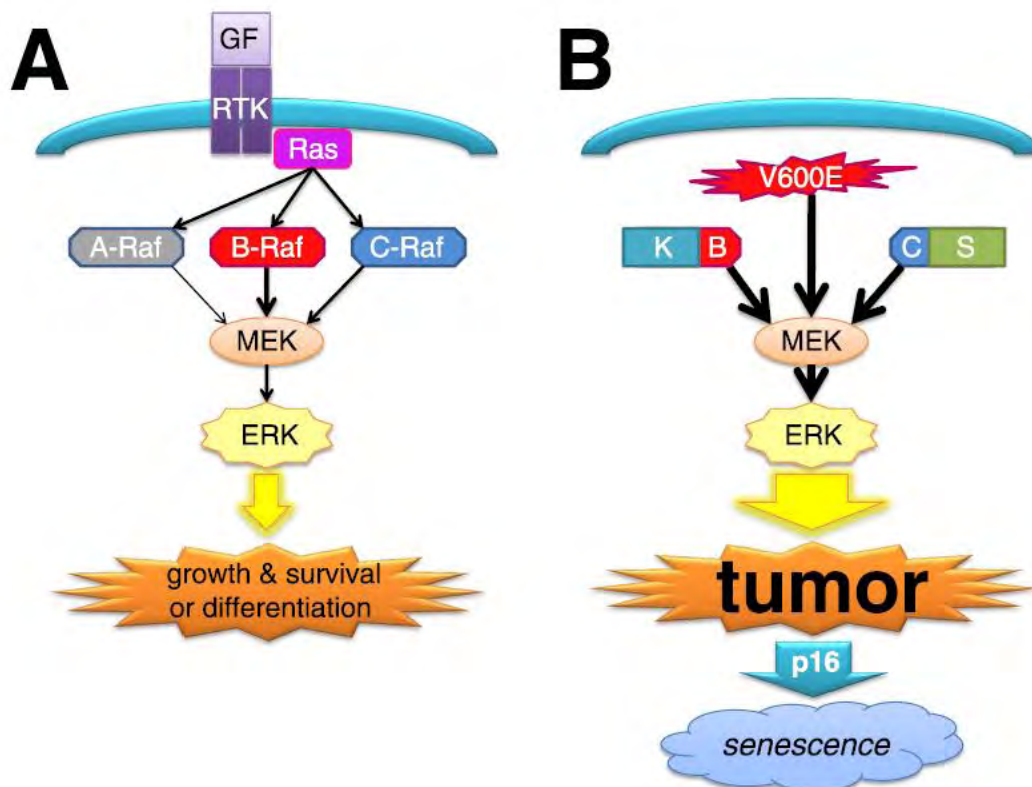


Abbildung 4: A; Darstellung der kontrollierten Signalkaskade, B; Darstellung der unkontrollierten Signalkaskade verursacht durch die V600E-BRAF-Mutation, Quelle [10], S.3

BRAF ist eine interzelluläre Serin-/Threoninkinase und spielt eine wichtige Rolle im MAP(mitogen-activated protein)-Kinase-Signalweg. Die Signalkette beginnt normalerweise mit der Aktivierung eines Transmembranrezeptors, dem Tyrosinrezeptor, der durch einen außerhalb der Zelle bindenden Wachstumsfaktor aktiviert wird. Der aktivierte Transmembranrezeptor ist nun in der Lage, das G-gekoppelte Ras-Protein zu binden, und durch Phosphorylierung zu aktivieren, wodurch das Ras-Protein ebenfalls Kinaseaktivitäten erhält. Aktiviertes Ras fungiert als Adapter und aktiviert im Gegenzug die Raf-Proteine, die in den drei Isoformen A-Raf, B-Raf und C-Raf vorkommen, wobei ausschließlich das B-Raf in neuronalem Gewebe vorkommt, und die anderen Isoformen in anderen Gewebearten vorhanden sind. Die aktivierten Raf-Proteine sind in der Lage, die dualspezifischen MAPK-Kinasen MEK 1/2 (MAPK/ERK Kinase) zu aktivieren, wobei das B-Raf einen viel stärkeren Aktivator für die MEK1/2 darstellt als das C-Raf, welcher aber im Gegenzug stärkere Aktivierungseigenschaften für die MEK1/2 aufweist als das A-Raf. Die beiden hierfür benötigten Phosphorylierungsstellen befinden sich in der Aktivierungsschleife von MEK. MEK Kinasen gehören zur kleinen Gruppe von dualspezifischen Kinasen, die sowohl Threonin, als auch Tyrosinreste phosphorylieren. Sie stimulieren den ERK1/2-Transkriptionskomplex durch Phosphorylierung eines Thr-Glu-Tyr Motivs in der Aktivierungsschleife und erst diese duale Phosphorylierung führt zur Ablesung von Genen, die für Zellteilung, Zellüberleben und Zelldifferenzierung verantwortlich sind. [10]

Die drei bereits erwähnten Isoformen des Raf-Proteins zeigen alle eine spezielle Konformation auf. Jedes dieser Proteine hat ein N-terminales Regulationszentrum, welches normalerweise das C-terminale Kinasezentrum blockiert. Sobald das Ras am N-terminalen Ende bindet, ist die Blockierung aufgehoben. Weil jedes der Raf-Proteine durch das Ras-Protein aktiviert werden kann, und seinerseits das MEK phosphoryliert, bringt es die Frage auf, wieso Mutationen am B-Raf-Protein von größerer Bedeutung sind als Mutationen am A-Raf bzw. C-Raf. B-Raf hat nur zwei Aktivierungsdomänen, wobei A-Raf und C-Raf vier solcher Domänen aufweisen. Dadurch ist das *BRAF*-Protein viel anfälliger gegenüber Mutationen, denn es reicht eine einzelne Mutation um die Funktion zu stören. Außerdem ist das aktivierte *BRAF* ein viel maßgebender Aktivator im Signalweg als die zwei anderen Isoformen, wodurch das onkogenetische Potential verstärkt wird. [10]

3. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die angewendeten Methoden kurz theoretisch beschrieben, sowie die verwendeten Stoffe, Geräte und Materialien genannt. Desweiteren erfolgt eine genaue Beschreibung der Durchführung.

3.1. Allgemeine Materialien

Die bei den folgenden Methoden verwendeten allgemeinen Materialien und Einwegartikel sowie ihre Hersteller werden nachfolgend aufgelistet.

Material	Hersteller
2 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf
1,5 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf
Graue Pipettenspitzen 1-10 µL	Eppendorf
Gelbe Pipettenspitzen 10-200 µL	Eppendorf
Blaue Pipettenspitzen 200-1000 µL	Eppendorf
PCR-Tubes	Sarstedt

Tabelle 2

3.2. DNA-Isolierung aus Humanproben

3.2.1. Gewebepreparation

Die zu untersuchenden Humanproben werden soweit präpariert, dass das vom Patienten entnommene Gewebe in Paraffinblöcken stabilisiert und gelagert wird. Für die Versuche werden 10 bis 20 µm Schnitte in sterilen 1,5 mL Zentrifugationsröhrchen vorgelegt.

Die Präparation der Gewebeschnitte erfolgt in den zwei Schritten, der Fixierung und der Einbettung in Paraffin.

Fixierung. Ziel ist es, den Zustand der Zellen im Gewebe möglichst naturgetreu zu fixieren. Veränderungen durch zum Beispiel noch aktive zelleigene Enzyme, die zur Autolyse führen können, müssen unterbunden werden. Standardmethode in der medizinischen Praxis ist die chemische Fixierung. Dabei wird die Gewebeprobe sofort nach Gewinnung in Formalin (4-10 % Formaldehyd in isotoner gepufferter Kochsalzlösung) gelegt. Hierbei erfolgt eine Vernetzung und leichte Denaturierung der Proteine. Lipide und nicht mit Proteinen assoziierte Kohlenhydrate werden nicht fixiert.

Einbettung in Paraffin. Ziel ist es, das Gewebe an einen Träger anzubringen und es somit zu stabilisieren. Dabei ist Paraffin ein beliebter Träger. Paraffin bezeichnet ein Gemisch aus Alkanen, das wachsartig und wasserabstoßend ist. Für die Einbettung wird das Gewebe mit flüssigem Paraffin durchtränkt, das nach Aushärtung in

Gewebekapseln überführt wird. Da Paraffin jedoch nicht mit Wasser mischbar ist, muss dem Gewebe vor der Einbettung das Wasser völlig entzogen werden, damit das Paraffin in das Gewebe eindringen kann. Die Entwässerung wird dadurch erreicht, dass das Wasser schrittweise durch Ethanol ersetzt wird. Dazu wird das Gewebe zuerst mit einem Alkohol-Wasser Gemisch versetzt und anschließend die Alkohol-Konzentration sukzessiv immer weiter erhöht, sodass sich immer mehr Alkohol im Gewebe ansammelt und das Wasser verdrängt. Ethanol wird anschließend durch ein Intermedium, in diesem Fall Xylol, verdrängt. Xylol hat sowohl hydrophile, als auch hydrophobe Eigenschaften. Demnach löst es sich in Ethanol und verdrängt diesen, damit das Gewebe anschließend mit Paraffin durchzogen werden kann, welches nach dem Abkühlen aushärtet. [11]

3.2.2. Isolierung des Gewebes auf dem Paraffinbett

Substanz/ Material/ Gerät	Hersteller
<i>Xylol</i>	<i>Th. Geyer</i>
<i>Vortex-Schüttler</i>	<i>Scientific Industries</i>
<i>Zentrifuge</i>	<i>Eppendorf, Centrifuge 5415 R</i>
<i>Abs. Ethanol</i>	<i>Th. Geyer</i>

Tabelle 3

Um genomische DNA aus dem Gewebe isolieren zu können, muss das Gewebe zuerst von dem Paraffinbett gelöst werden, sodass es in freier Form vorliegt. Wie in *Abschnitt 3.2.1.* beschrieben, handelt es sich bei Xylol um ein Intermedium. Durch Zugabe von ca. einem Milliliter Xylol kann umgekehrt das Paraffin wieder gelöst werden, wobei bei diesem Schritt die hydrophoben Eigenschaften des Xylols von Bedeutung sind. Bei Proben mit viel eingebettetem Paraffin müssen die geschlossenen Zentrifugationsröhrchen stark geschüttelt werden, entweder manuell mit der Hand oder mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers. Anschließend werden die Zentrifugationsröhrchen mit dem gelösten Paraffin für ca. 10 Minuten zentrifugiert. Dies ist erforderlich, damit sich das freigelegene Gewebe als Pellet absetzt und das im Xylol gelöste Paraffin im Überstand befindet. Bei Proben mit viel Paraffin ist ein erneutes Lösen in Xylol und ein Zentrifugationsschritt erforderlich. Nach vorsichtiger Entnahme des Überstands wird im nächsten Schritt das Gewebe gewaschen, also das im Pellet noch enthaltene Xylol eliminiert. Dazu wird das Gewebe in ca. einem Milliliter absolutem Ethanol gelöst, wobei in diesem Schritt wiederum die hydrophilen Eigenschaften des Xylols von Bedeutung sind. Die Zentrifugationsröhrchen werden bei zu stark abgesetztem Pellet erneut mit dem Vortex-Schüttler behandelt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand mit den in Ethanol gelösten Xylolresten entfernt. Die Röhrchen werden anschließend für ca. eine Stunde geöffnet aufgestellt, damit das im Pellet enthaltene Ethanol verdampfen kann.

3.2.3. Gewebeverdau

Substanz/ Material/ Gerät	Hersteller
Proteinase K, 20 mg/mL Lysispuffer Thermo-Schüttler	Roth Institut Neuropathologie Eppendorf

Tabelle 4

Zur Extraktion von Nukleinsäuren aus dem Gewebe wird die Proteinase K von der Firma *Roth* eingesetzt.

Proteinase K ist eine Serinprotease mit starker proteolytischer Aktivität, das heißt sie hydrolysiert Proteine in einzelne Aminosäuren. Die Proteinase wird von differenzierten Kulturen des Schimmelpilzes *Tritirachum album* sekretiert, wobei das ‚K‘ im Namen den Verdau von Kreatin zur Deckung des Kohlen- und Stickstoffhaushaltes des Pilzes anzeigt. [12]

In Lösungen ist das Enzym sehr stabil und zeigt sehr breite Toleranzbereiche für Temperatur und pH- Wert. Das Enzym zeigt eine Stabilität bei pH- Werten von 4 bis 12,5, wobei das Optimum bei pH 8 liegt und arbeitet problemlos bei Temperaturen von 37°C bis 56°C mit 56°C als Optimaltemperatur. [12]

Proteinase K ist ein recht unspezifisches Enzym mit einer breiten Variabilität der geschnittenen Peptidbindungen, allerdings zeigt sie eine Vorliebe für Bindungen C-terminal von aromatischen und ungeladenen Aminosäuren. Das Enzym besitzt zwei Bindungsstellen für Ca^{2+} - Ionen, die zwar nicht in die Katalyse eingreifen, aber zur strukturellen Stabilität des Proteins beitragen. Obwohl die Aktivität bei Abwesenheit von Ca^{2+} leicht vermindert ist, ist die Gesamtaktivität aber dennoch so hoch, dass ein Proteinase K- Verdau meist unter Anwesenheit von EDTA durchgeführt wird. [12]

Für den Verdau werden die getrockneten Gewebestücke in 700 μL Lysispuffer gelöst, anschließend erfolgt, je nach Gewebemenge, eine Zugabe von 10 bis 25 μL Proteinase K. Proteine werden komplett verdaut, wenn die Inkubationszeit lang genug ist und die Protease- Konzentration hoch ist. Deswegen erfolgt die Inkubation der Proben über Nacht bei 56 °C in einem Thermo-Schüttler, der Optimaltemperatur für das Enzym. In der folgenden Tabelle ist zusammengefasst, wie der Lysispuffer zusammengesetzt ist.

Komponente	Konzentration
SDS	1 %
NaCl	0,1 M
EDTA	0,1 M
Tris, pH 8	0,05 M
Steriles Wasser	-

Tabelle 5

3.2.4. DNA- Extraktion

Substanz/ Material/ Gerät	Hersteller
5 M Natriumchlorid-Lösung	Institut Neuropathologie
Chloroform	Th. Geyer
Isoamylalkohol	Th. Geyer
Zentrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5415 R

Tabelle 6

Die über Nacht inkubierten Proben müssen am nächsten Tag klar sein, die Proben dürfen keine Schlieren aufweisen. Nur dann ist das Gewebe vollständig verdaut. Bei Proben, die noch Schlieren oder kleine Stückchen enthalten, erfolgt je nach Gewebemenge eine erneute Zugabe von 2 bis 10 µL der Proteinase K mit anschließender Inkubation.

Um die Proteine beziehungsweise Aminosäuren aus der wässrigen Nukleinsäure-Lösung zu entfernen, folgt eine einfache Extraktion. In jedes Zentrifugationsröhrchen wird 250 µL 5 M Natriumchlorid- Lösung und 400 µL einer Chloroform-Isoamylalkohol- Mischung im Verhältnis zu 24:1 hinzu pipettiert. Die Röhrchen werden gut geschüttelt, wobei sich der Inhalt milchig weiß färbt und es folgt eine Zentrifugation für 10 Minuten bei höchster Drehzahl (16.100 xg), um die Phasentrennung zu beschleunigen.

Unverdautes Restgewebe und hydrolysierte Proteine sammeln sich an der Grenze zwischen den beiden Phasen, Fette sammeln sich in der organischen Phase, also in der unteren Chloroform- Phase. DNA reichert sich stark in der oberen wässrigen Phase an und kann leicht von der organischen und der Zwischenphase getrennt werden. Ein Schäumen der organischen Phase, welches das Pipettieren behindert, wird durch die Zugabe einer kleinen Menge Isoamylalkohol wie vorher beschrieben verhindert. Isoamylalkohol wirkt also als Antischaummittel. [13] [14]

3.2.5. DNA- Fällung

Substanz/ Material/ Gerät	Hersteller
Isopropanol	Th. Geyer
70 %-tiges Ethanol	Th. Geyer

Tabelle 7

Der entnommene Überstand wird in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Nukleinsäuren sind noch mit anderen wasserlöslichen Komponenten verunreinigt und stark verdünnt. Durch Ausfällung mit Alkoholen, in diesem Fall Isopropanol, werden die Nukleinsäuren weiter gereinigt. Hierfür wird dem Überstand 550 µL Isopropanol zugesetzt. Um eine bessere Ausfällung zu erhalten, wurde im vorherigen *Abschnitt 3.2.4.* eine 5 molare Natriumchlorid- Lösung zugegeben. Die Natrium-Ionen neutralisieren die negativen Ladungen der DNA, sodass die Fällung leichter wird. Die neutralen DNA- Moleküle lösen sich nicht mehr in der hydrophilen Alkohol-Lösung und setzen sich als Präzipitat ab. Durch Zentrifugation kann dieser Prozess

beschleunigt werden, zudem enthält man ein festeres Pellet. Der Überstand, der alle Verunreinigungen enthält, wird abgesaugt und das weiß gefärbte Pellet erneut mit 70 % - tigem Ethanol gewaschen, um möglicherweise mitgefällte Salze zu entfernen. Nach Entfernen des Ethanols wird das Pellet für ca. eine Stunde getrocknet. [13]

3.2.6. DNA- Lösung

Substanz/ Material/ Gerät	Hersteller
Steriles Wasser	Baxter S.A.
Thermo-Schüttler	Eppendorf

Tabelle 8

Die getrockneten Pellets werden, je nach Pelletsgröße, in 30 bis 100 μL sterilem Wasser gelöst. Eine Inkubation in einem Schüttler bei 37 °C und 850 rpm für 10 Minuten beschleunigt diesen Prozess.

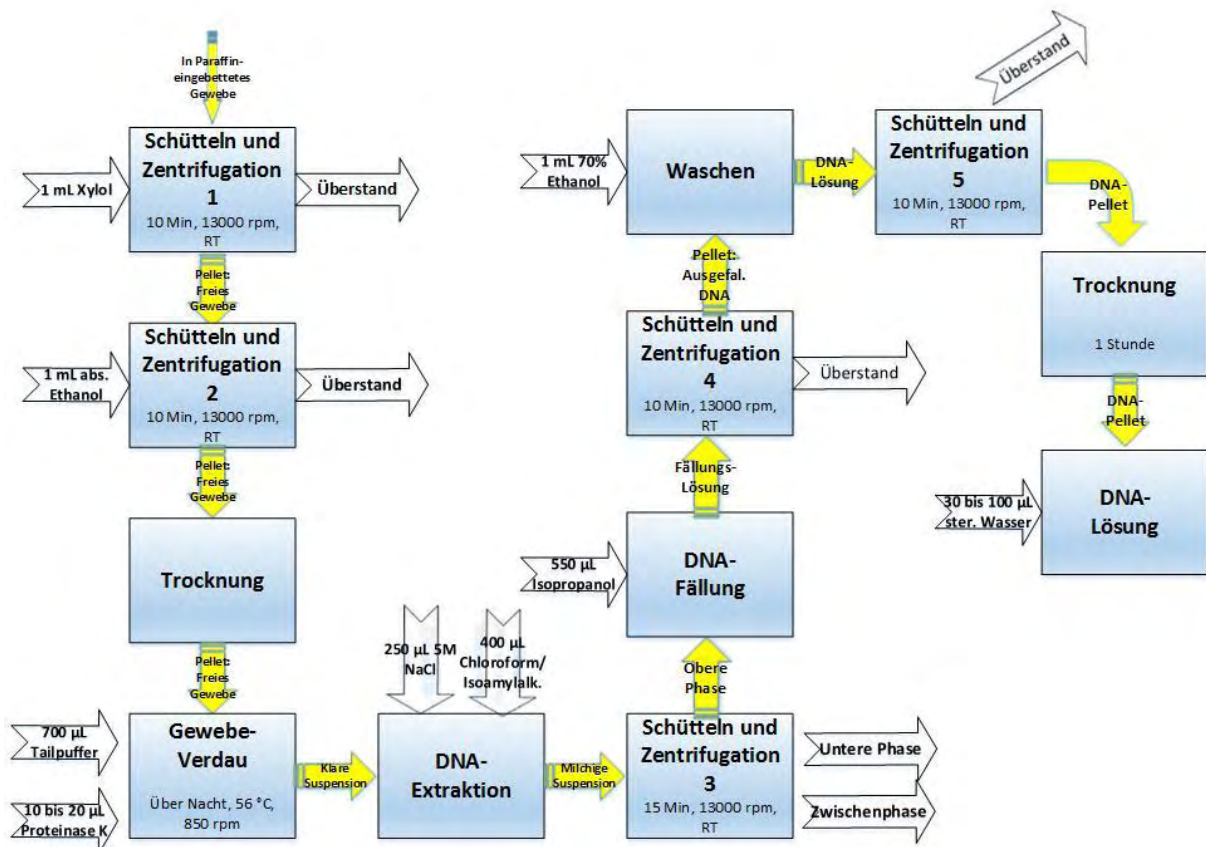


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung

3.3. DNA- Konzentrationsbestimmung

Substanz/ Material/ Gerät	Hersteller
Steriles Wasser Quarzküvette, 50-2000 μL , 220-1600 nm Photometer	Baxter S.A. Eppendorf Eppendorf, BioPhotometer plus

Tabelle 9

Die Konzentrationsbestimmung der DNA- Lösung ist ein wichtiger Schritt, denn sie liefert wichtige Informationen über die einzusetzenden Volumina für die PCR. Die Mengenbestimmung von DNA in wässriger Lösung erfolgt photometrisch anhand der Adsorption bei 260 nm. Demgemäß muss diese spektralphotometrische Messung in einer Quarzküvette vorgenommen werden. Hierzu wird zunächst eine geeignete Verdünnung hergestellt, in diesem Fall 3 μL Probe zu 90 μL steriles Wasser, anschließend wird die optische Dichte gemessen. Anhand der in das Photometer als Parameter eingegebener Verdünnung erhält man die Konzentration in der unverdünnten DNA- Lösung. Enthält die verdünnte Messprobe 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doppelstrang-DNA, resultiert bei 1 cm Schichtdicke eine Absorption oder Extinktion von 1,0.

Ein Reinheitskriterium für die DNA- Präparation ist der Quotient aus den gemessenen optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm. Proteine zeigen eine starke Adsorption bei 280 nm. Ein Wert von 1,8 deutet auf eine reine DNA- Präparation hin. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, während deutlich höhere Werte meist durch Schwebeteilchen bedingt sind, die sich leicht durch Abzentrifugieren und Überführen des Überstands in ein frisches Reaktionsgefäß von der Lösung abtrennen lassen.

3.4. Polymerase-Kettenreaktion

Material/ Gerät	Hersteller
PCR-Maschine	Biorad, T100 Thermal Cycler

Tabelle 10

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein sehr wichtiges Verfahren, um kleinste Mengen DNA schnell zu vervielfältigen und heutzutage im Laborbetrieb nicht mehr wegzudenken. Der generelle Ablauf der PCR besteht aus den drei Schritten: Denaturierung, Primer-Annealing und Primer-Extension. Im ersten Schritt muss die zu amplifizierende DNA in die zwei Einzelstränge geteilt werden. Dies ist durch eine Temperaturerhöhung auf 92 °C möglich, wobei die Wasserstoffbrücken-Bindungen kaputt gehen. Im nächsten Schritt müssen die spezifischen Primer an die entsprechende DNA-Region binden. Hierfür muss die Temperatur so gewählt werden, dass sie zum einen nicht zu hoch ist, da der Primer so nicht binden kann, zum einen darf sie aber auch nicht zu niedrig sein, da sie sonst an anderen Stellen

der DNA bindet. Die übliche Temperatur liegt zwischen 50 bis 60 °C. Sobald der Primer angelagert ist, erkennt die DNA-Polymerase das freie 3'-Ende des Primers und fügt nun einzeln Nukleotide zu, dabei dient die genomische DNA als Template. Die DNA-Polymerase arbeitet bei einer Temperatur von 72 °C optimal. Diese drei Schritte aufeinanderfolgend stellen einen Zyklus dar, normalerweise besteht eine Amplifizierung jedoch aus 35 bis 40 Zyklen. [15]

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturierung	94	20
Primer-Anlagerung	54°C (WT)/ 68°C (MUT)	30
DNA- Polymerisation	72	20
Anzahl der Zyklen: 35		

Tabelle 11: Die Parameter wurden teilweise, wie sie in der Publikation [8] beschrieben waren, übernommen, jedoch erfolgte eine Anpassung der Primer-Annealing Temperatur, welche im nächsten Kapitel erläutert wird.

Für diese Arbeit wurde für die Analyse von DNA- Sequenzen die ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System) angewandt. Diese Methode erlaubt eine Genotypisierung von biologischen Proben (z.B. Gliomen). Hierbei wird ein wildtypspezifischer Primer verwendet, der nur bindet wenn auf einem Allel die Wildtypsequenz des gesuchten Gens vorhanden ist, und zusätzlich noch ein mutationsspezifischer Primer, der ebenfalls nur bindet, wenn die gesuchte Mutation auf einem Allel auftritt.

Exon 15

```

1 aatcttaaaa gcagggtata taggctaaat agaactaatac attgttttag acataacttat
61 tgactctaaag aggaaagatg aagtactatg ttttaaagaa tattatatta cagaattata
121 gaaattagat ctcttaccta aactcttcac aatgcttgct ctgataggaa aatgagatct
181 actgttttcc ttacttactt acacctcaga tatattttctt catgaagacc tcacagttaa
241 aataggtgat tttggctctag ctacggaata atctogatgg agtgggtccc atcagtttga
301 acagttgtct ggatccattt tgtggatggt aagaattgag gctatatttc cactgatata
361 atttttggcc ctgagatgct gctgagttac tagaaagtca ttgaaggctc caactatagt
421 attttcatag ttcccagtat tcacaaaaat cagtgttctt attttttatg taaatagatt
481 ttttaacttt tttctttacc cttaaaaacga atattttgaa accagtttc

```



Abbildung 6: Darstellung der Primer: wildtypspezifisch (links) und V600E-mutationsspezifisch (rechts)

Insgesamt werden für die Genotypisierung vier verschiedene Primer gebraucht: Ein mutationsspezifischer (Rimut), ein wildtypspezifischer (Fiwt) und zwei um das Exon 15 liegende Primer (*Fo-Ro* / *F1-R1*). Kombiniert können die Primer so wie auf dem folgendem Bild dargestellt. Man kann drei unterschiedlich große PCR-Produkte erhalten, wobei das Exon 15-PCR-Produkt entweder zur Kontrolle dienen kann, aber auch um die genomische DNA auf die Zielsequenz zu konzentrieren. Erst danach erfolgt die Untersuchung auf Mutation und Wildtyp. Dabei werden zwei PCR-Schritte hintereinander geschaltet, wobei das Produkt der ersten PCR zur Analyse bei der zweiten PCR eingesetzt wird. Die Kopplung von zwei PCR-Schritten ist vor allem bei niedriger DNA-Konzentration von Vorteil.

Die folgende Tabelle zeigt die möglichen PCR-Produkte, die bei den verschiedenen Primer-Kombinationen zu Stande kommen. Denn wie schon erwähnt, hat man für die um das Exon 15 liegende Sequenzen zwei verschiedene Primer-Kombinationen getestet und verwendet.

Identifikation	Forward-Primer	Revers-Primer	PCR-Produkt [bp]
<i>Exon 15</i>	<i>Fo</i>	<i>Ro</i>	200
<i>Wildtyp</i>	<i>Fiwt</i>	<i>Ro</i>	99
<i>Mutation</i>	<i>Fo</i>	<i>Rimut</i>	144
<i>Exon 15</i>	<i>F1</i>	<i>R1</i>	173
<i>Mutation</i>	<i>F1</i>	<i>Rimut</i>	134

Tabelle 12: Auflistung der PCR-Produkte

Neben den Primern, die die gewünschte Sequenz markieren, werden noch zusätzlich freie Nukleotide zur Bildung des neuen Stranges, die hitzeresistente Taq-Polymerase zum aneinander heften der Nukleotide und ein Taq-Puffer, der Energiemoleküle wie ATP zur Verfügung stellt, benötigt. Die folgende Tabelle zeigt, in welchen Mengen die einzelnen Bestandteile pro Mix eingesetzt werden.

	Volumen [μ L]	Konzentration	Hersteller
<i>Steriles Wasser</i>	18,9	-	<i>Baxter S.A.</i>
<i>dNTPs, freie Nukleotide</i>	1	10 mM	<i>Fermentas</i>
<i>Foward-Primer</i>	1	10 mM	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
<i>Revers-Primer</i>	1	10 mM	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
<i>Taq-Buffer</i>	2,5	10 mM	<i>Fermentas</i>
<i>Tap-Polymerase</i>	0,125	10 mM	<i>Fermentas</i>
<i>DNA-Lösung</i>	2 - 4	50 - 130 ng/ μ L	-
Σ	26 - 28	-	-

Tabelle 13: Die Mix-Zusammensetzungen stammen aus vorherigen internen Experimenten und wurden für dieses Projekt soweit übernommen. In der Publikation [8] selbst sind andere Mix-Verhältnisse angegeben.

3.5. Gelelektrophorese

Material/ Gerät	Hersteller
Glasplatten, 1,5 mm	Biorad
Halterung	Biorad
15-Well Kämmen, 1,5 mm	Biorad
Gelkammer	Biorad
Spannungsquelle	Biorad
0,5xTBE Puffer	Institut Neuropathologie
Blaupuffer/ Laufpuffer	Sigma

Tabelle 14

Die Gelelektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird. [16]

Nukleinsäuren sind Polyanione, d.h. sie sind aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Im elektrischen Feld wandern Polyanione zur Anode, und zwar umso schneller, desto kleiner sie sind. In der Gelelektrophorese wird üblicherweise Agarose, bei sehr kleinen Nukleinsäuren auch Polyacrylamid als Matrix in Form eines Gels eingesetzt. Die Porengröße im Gel bestimmt, wie schnell eine Nukleinsäure mit einer bestimmten Größe zur Anode wandern kann. Bei längeren Fragmenten liegt eine stärkere Reibung als bei kürzeren Fragmenten vor, sie werden dadurch proportional stärker zurückgehalten und wandern daher langsamer. So wird in der Gelelektrophorese nicht nur eine Trennung der Moleküle erreicht, sondern auf der Basis der relativen Wanderungstrecke kann auch die Länge eines DNA- oder RNA-Fragmentes im Vergleich zu einem Standard mit bekannter Fragmentgröße berechnet werden. [16]

Anders als bei Proteinen ist bei Nukleinsäuren das Verhältnis zwischen Ladung und Größe (in Basenpaaren) konstant. Für lineare doppelsträngige DNA-Fragmente besteht im elektrischen Feld über einen weiten Größenbereich der DNA eine lineare Abhängigkeit zwischen dem dekadischen Logarithmus der Fragmentlänge (in Basenpaaren) und der relativen Wanderungsdistanz (in cm, bezogen auf die gesamte Wanderungstrecke).

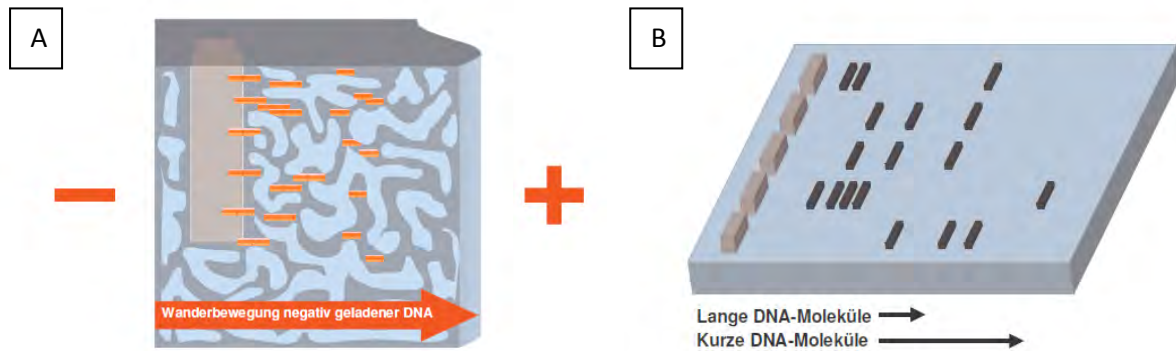


Abbildung 8: Die oben dargestellten Abbildungen zeigen gut das Prinzip der Gelelektrophorese-Trennung. In der Abbildung A ist die Abhängigkeit der Reibfläche mit der Molekülgröße dargestellt. In der Abbildung B ist die Größentrennung dargestellt. Quelle [16]

Da es sich bei diesem Projekt um sehr kleine PCR-Produkte handelt, werden statt Agarose-Gele Polyacrylamid-Gele als Matrix eingesetzt, die sehr viel effizienter in der Trennung von kleinen Fragmenten sind. Die Polyacrylamid-Gele werden selbst hergestellt.

	Volumen	Konzentration	Hersteller
<i>Steriles Wasser</i>	15 mL	-	<i>Baxter S.A.</i>
<i>5x TBE-Puffer</i>	2,2 mL	5x	<i>Institut Neuropathologie</i>
<i>Acrylamid-Lösung</i>	4,5 mL	40 %	<i>Roth</i>
<i>APS (Ammoniumpersulfat)</i>	200 µL	10 %	<i>Institut Neuropathologie</i>
<i>TEMED (Tetramethylethyldiamin)</i>	20 µL	-	<i>Sigma</i>

Tabelle 15: Die Angaben für die Zusammensetzung gelten für zwei 8%-tige Acrylamid-Gele. Die Quervernetzung des Acrylamids wird einerseits durch den Radikalstarter APS sowie dem Polymerisierungskatalysator TEMED katalysiert.

Die Glasplatten werden hierzu mit Ethanol gereinigt, in die entsprechenden Halterungen eingebaut und das noch flüssige Gel wird mit einer 5 mL Pipette zügig zwischen den zwei abgedichteten Glasplatten gegossen, die durch einen Abstandhalter (Spacer) voneinander getrennt sind (der Abstand beträgt etwa 1,5mm). Die Kämme werden unmittelbar danach eingesetzt. Nach ca. 10 Minuten ist das Gel auspolymerisiert und die Glasplatten können aus den Halterungen entnommen und in die Kammern des Elektrophorese-Apparats eingespannt werden. Um kleinste Verunreinigungen zu entfernen, werden die Gele vor dem Beladen ca. 15 Minuten bei 30 V vorlaufen gelassen.

Bevor die PCR-Proben auf das Gel aufgetragen werden, müssen sie mit einem 6x Laufpuffer versetzt werden. Dieser erhöht die Dichte der Proben und führt dazu, dass sie sich schneller beim Laden in der Tasche absetzen, wodurch der Beladungsprozess wesentlich vereinfacht wird. Außerdem entsteht eine blaue

Lauffront, die beim Lauf erkennen lässt, wie weit die Proben auf dem Gel schon gelaufen sind. Üblich ist eine Zugabe von 5 µL Laufpuffer zu einer 25 µL Probe, um eine 1x Konzentrierung des Laufpuffers zu erhalten.

Neben den zu untersuchenden Proben wird zusätzlich immer ein Marker namens 20 bp DNA-Leader der Firma Thermo Scientific aufgetragen. Die Zusammensetzung des Markers können dem Anhang entnommen werden.

Parameter	Einstellung des Parameters
<i>Gel-Eigenschaften</i>	<i>8%-tiges Gel, 15 Taschen</i>
<i>Laufpuffer</i>	<i>0,5x TBE-Puffer</i>
<i>Spannung</i>	<i>105 V</i>
<i>Strom</i>	<i>60-80 mA</i>
<i>Laufzeit</i>	<i>70 Minuten</i>

Tabelle 16: Die folgende Tabelle zeigt die eingestellten Parameter für die durchgeführten Experimente

3.6. Ethidiumbromid-Färbung

Substanz/ Material	Hersteller
Ethidiumbromid	Sigma

Tabelle 17

Ethidiumbromid (3,8 Amino-5-ethyl-6-phenylphenanthridium-bromid, Homidiumbromid) gehört zu den DNA-bindenden Substanzen, die aufgrund einer planaren Struktur in der Lage sind, sich reversibel in die Basenabfolge einzulagern. In der Molekularbiologie wird Ethidiumbromid zum Anfärben der DNA in Elektrophorese-Gelen eingesetzt. Bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 300 nm, tritt eine Fluoreszenz im sichtbaren Bereich auf.

Das fertig gelaufene Gel wird für 10 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad inkubiert und anschließend mit einem Fluoreszenz-Messgerät aufgenommen und abfotografiert.

3.7. DNA-Sequenzierung

Einige der Proben werden zur Kontrolle zum externen Sequenzieren zu der Firma *EUROFINS MWG Operon* geschickt. Dazu wird das Fo-Ro- bzw. F1-R1-Template der jeweiligen Probe erzeugt, 15 µL dieser DNA-Lösung entnommen und mit 2 µL Forward-Template (Fo bzw F1) gemischt und zum Sequenzieren geschickt.

4. Ergebnisse

Teil 1: Etablierung einer Methode zur Detektion einer BRAF-V600E-Mutation bei Humanproben

Als Vorlage für die Entwicklung dient die in der Publikation [8] beschriebene Methode.

4.1. Optimierung des Pipettierschemas der PCR

Das Pipettierschema in der Publikation [8] ist sehr aufwendig, denn die unterschiedlichen Primer werden in unterschiedlichen Mengen hinzugegeben, was ein ständiges Umstellen der Pipette mit sich zieht. So ein umständliches Verfahren kann später im Routinebetrieb schwer umgesetzt werden. Daher wird das vom Institut selbst entwickelte Pipettierschema, das bereits für viele PCR-Methoden getestet und eingesetzt wird, verwendet. Es hat den Vorteil, dass man einerseits mit den gewohnten Mengen an Zugabelösungen arbeitet, andererseits handelt es sich um ein sehr einfaches Pipettierschema, ohne das ein ständiges Umstellen der Pipette erforderlich ist. Das Pipettierschema ist in *Tabelle 13* erläutert.

4.2. Optimierung der Primer-Zugabe

Anzahl der Primer im Mix. Das Verfahren in der Publikation [8] beinhaltet, dass alle vier Primer (*Fo*, *Ro*, *Fiwt*, *Rimut*) gleichzeitig in die PCR-Reaktionsgefäße gegeben werden und sich so die drei unterschiedlichen PCR-Produkte in einem Ansatz bilden. Nach mehrmaligen Versuchen ist dieser Fall bei den selbst durchgeführten Experimenten nicht aufgetreten. Vielmehr bildet sich ausschließlich das 97 bp-Produkt (WT). Trotz der hohen Schmelzpunkt-Differenz zu den anderen Primern scheint der *Fiwt*-Primer die stärkste Affinität zur DNA zu haben.

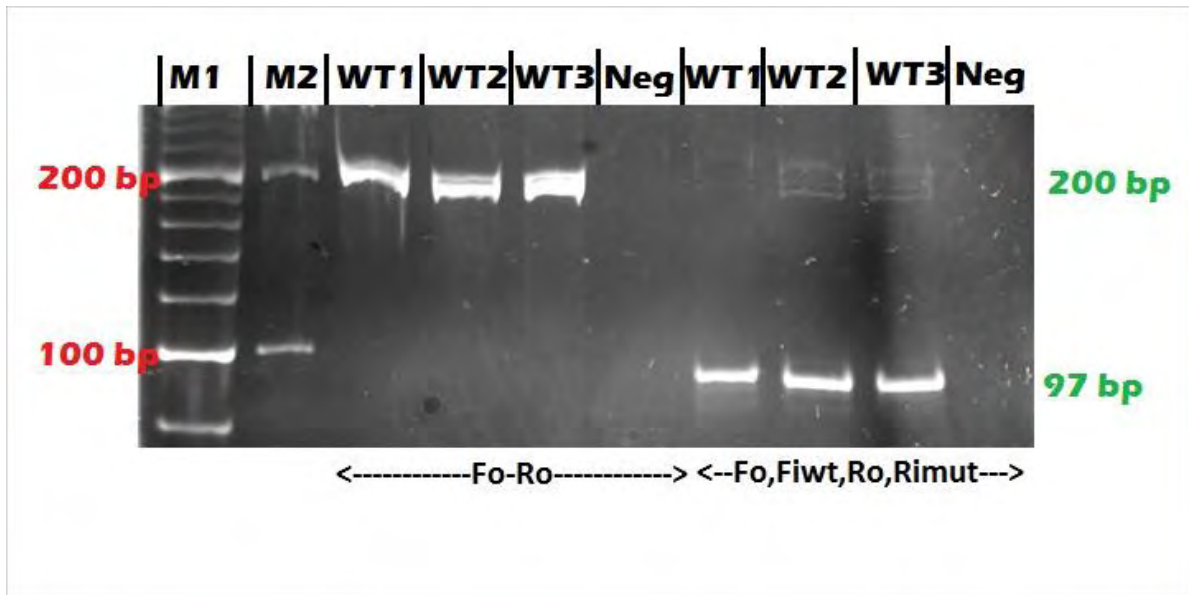


Abbildung 9: M1:Marker 1, M2: Marker 2, WT1/WT2/WT3: Wildtyp-Proben. Rechts ist die Kontroll-PCR mit den Fo-Ro-Primern dargestellt. Links sind alle vier Primer im Reaktionsmix enthalten. Annealing-Temperatur liegt bei 68°C.

In der obigen Abbildung sieht man sehr schön, dass bei alleiniger Zugabe der Kontroll-Primer (*Fo* und *Ro*) dicke 200 bp-Banden entstehen, jedoch sind diese kaum sichtbar, wenn der *Fiwt*-Primer ebenfalls vorhanden ist. Er ist dominanter und bindet an die entsprechende DNA-Sequenz. Dadurch werden zum einen die *Ro*-Primer zum anderen aber auch die Nukleotide verbraucht, sodass nur wenige 200 bp-Produkte entstehen können.

Aus diesem Grund scheint es relevanter zu sein, die Mutations-Analyse getrennt von der Wildtyp-Analyse durchzuführen, um solche Behinderungen der Primer untereinander zu vermeiden.

Primer-Zusammensetzung. Wie im Methodenteil schon erwähnt, wurden zwei verschiedene Primerpaare, die sich um das Exon 15 anlagern, verwendet und getestet. Die spezifische Amplifizierung von Exon 15 hat zwei Vorteile; zum ersten dient es zur Kontrolle, ob die zu untersuchende DNA-Lösung überhaupt das Exon 15 beinhaltet. Zum anderen kann ein Exon 15 Template erschaffen werden, mit dem dann spezifisch die Analysen durchgeführt werden.

Forward-Primer	Revers-Primer	PCR-Produkt	Literatur und Annealing-Temperatur
<i>Fo</i>	<i>Ro</i>	200 bp	[8] 68°C
<i>F1</i>	<i>R1</i>	173 bp	[9] 56°C

Tabelle 18

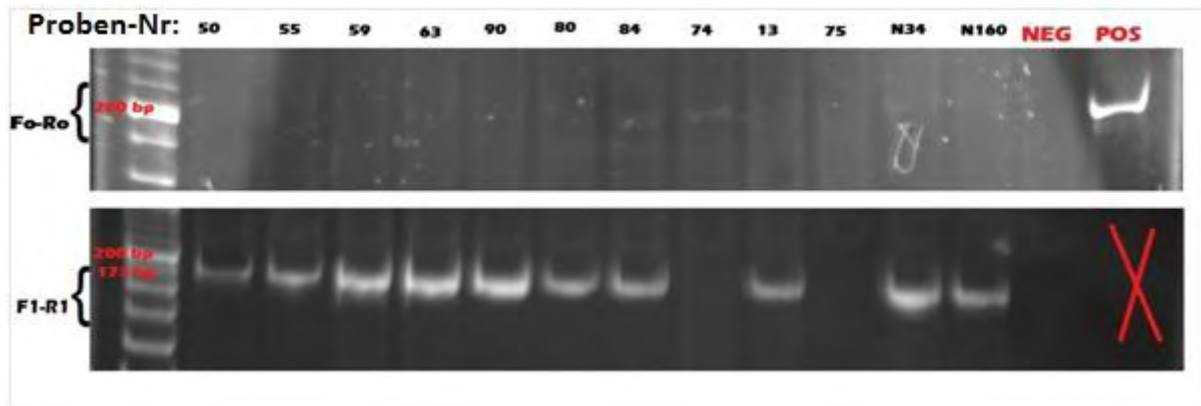


Abbildung 10: PCR-Erfolg der Fo-Ro-PCR im Vergleich zur F1-R1-PCR bei gleichen Proben. 50,55,59,63,90,80,84,74, 13,75,N34,N160 stammen aus der internen Probennummerierung für die statistische Analyse.

Die obige Abbildung zeigt sehr deutlich, dass die Bindungsaffinität der *F1-R1*-Primer höher ist als die der *Fo-Ro*-Primer, denn es sind sehr viel mehr und dickere Banden im zweiten Gel zu erkennen. Bei beiden Durchläufen wurden dieselben DNA-Proben verwendet und die PCR-Bedingungen so wie in den Publikationen [8][9] beschrieben gewählt.

Zur Erzeugung des Exon 15-Templates eignet sich demnach das *F1-R1*-Primerpaar. Um aus diesem Template die Mutations- und Wildtypanalyse durchführen zu können, müssen die im nächsten Schritt verwendeten Primer unbedingt im Sequenzbereich des Templates binden. Dies trifft nicht für den *Fo*-Primer zu, denn er liegt zum Teil außerhalb des Bereiches. Er kann durch den *F1*-Primer ersetzt werden, der sich nur um wenige Basenpaare unterscheidet. Der *Ro*-Primer jedoch liegt innerhalb der Template-Sequenz und kann somit weiter verwendet werden. Somit ergeben sich folgende Primer-Zusammensetzungen für die Analysen.

<i>Primer-Zusammensetzung</i>			
Wildtyp-Analyse		Mutations-Analyse	
Foward-Primer	Revers-Primer	Foward-Primer	Revers-Primer
FIWT	Ro	F1	Rimut
97 bp		134 bp	

Tabelle 19

4.3. Optimierung der Primer-Annealing Temperatur

Wie in *Abbildung 10*. erkennbar, wurde für das Verfahren eine Annealing-Temperatur von 68 °C verwendet. Beim Durchführen der PCR mit der angegebenen Annealing-Temperatur waren auf dem Gel keinerlei Banden erkennbar. Vielmehr waren auf dem unteren Teil des Gels verschwommene Banden abgebildet, die unspezifische Primerbindungen darstellen. Die PCR hat also nicht geklappt, da die Primer nicht in der Lage waren zu binden. Gründe dafür könnten einerseits die falsche Primerlänge aber auch die falsche Primer-Annealing-Temperatur sein.

Die Primer müssen so gewählt werden, dass sie spezifisch hybridisieren. Das heißt, sie dürfen nur an der gewünschten Stelle an der DNA binden. Zu beachten ist dabei, dass das menschliche Genom aus ca. 3.000.000.000 Basenpaaren besteht.

Primerlänge. Ein Primer darf einerseits nicht zu kurz gewählt werden, da sonst die Wahrscheinlichkeit zu groß ist, dass es unspezifisch bindet. Ab einer Länge von 17 Nucleotiden ist ein Primer spezifisch, bezogen auf das menschliche Genom. [19] Die in den Versuchen verwendeten Primer zeigen Größen ab 22 bp und sind demnach spezifische Primer.

Annealing-Temperatur. Die ideale Hybridisierungstemperatur (Annealing-Temperatur) muss einerseits so niedrig sein, dass es zur Hybridisierung zwischen Primer und Matrize kommt, und andererseits so hoch, dass sich keine fehlgepaarten Hybride bilden. Diese Temperatur kann man abschätzen, indem man die Schmelztemperatur (T_m) des Hybrids aus Primer und Matrize ermittelt. Bei T_m dissoziiert („schmilzt“) das vollständig gepaarte Hybrid; bei 1 bis 2°C darunter können sich in der Regel nur richtige Hybride zwischen Primer und Matrize bilden. [19] Formel zur Ermittlung der T_m :

$$T_m = 4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T) [^{\circ}\text{C}]$$

Die Hybridisierungstemperatur in einem PCR-Experiment sollte dann für beide Primer ca. 1 bis 2 °C unter der T_m liegen.

Oligo Name	Oligo #	Len	Pur	Scale	MW	T_m°
BRAF Fo	8016310431-000010	25	RP1	0.025	7601	62.1
BRAF Ro	8016310431-000020	21	RP1	0.025	6264	62.2
BRAF Fwt	8016310431-000030	22	RP1	0.025	6775	56.6
BRAF Rimut	8016310431-000040	20	RP1	0.025	5991	63.0

Oligo Name	Oligo #	Len	Pur	Scale	MW	T_m°
BRAF-F1	8016261950-000010	22	RP1	0.025	6793	63.1
BRAF-F2	8016261950-000020	21	RP1	0.025	6383	51.4
BRAF-R1	8016261950-000030	20	RP1	0.025	6092	63.4

Abbildung 11: Der F2-Primer gehört zu den vielen getesteten Primern und ist in im Datenblatt der Firma Sigma ebenfalls verzeichnet.

Auf dem Datenblatt der Firma Sigma sind alle Schmelztemperaturen der jeweiligen Primer bei der Lieferung mit angegeben. Erkennbar ist, dass die Kontroll-Primer (Fo-Ro oder F1-R1), die sich um Exon 15 anlagern, so gewählt sind, dass sie fast identische Schmelzpunkte aufweisen. Die zwei anderen Primer (Rimut, Fwt), die mutations- und wildtypspezifisch binden, weisen jedoch einen recht großen

Unterschied in der Schmelztemperatur auf. Dies könnte bei der Wahl einer gemeinsamen Annealing-Temperatur und damit einem einzigen PCR-Programm für beide Analysen ein Hindernis darstellen, da im Normalfall sich die Annealing-Temperatur bis zu 2 °C von der Schmelztemperatur unterscheiden sollte.

Aus diesem Grund wurde eine Gradienten-PCR mit vier verschiedenen Primer-Annealing-Temperaturen pro Analyse durchgeführt und dann später auf den Gelen ausgewertet, bei welcher Temperatur die Banden am klarsten erkennbar sind und die unspezifischen Primerbindungen am wenigsten vorhanden sind. Hierfür wurde ein Temperaturgradient von 54 bis 60 °C in der PCR-Maschine für die Wildtypanalyse eingestellt, für die Mutationsanalyse wurde ein Temperaturgradient von 60 bis 68 °C gewählt. In der folgenden Abbildung sind die Temperaturen in den einzelnen Wells für die Wildtypanalyse beispielhaft angezeigt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				60 °C								
B				59,5 °C								
C				58,8 °C								
D				57,7 °C								
E				56,3 °C								
F				55,2 °C								
G				54,4 °C								
H				54 °C								

Nur die in rot markierten Temperaturen wurden für drei Proben mit jeweils den gleichen Primer-Zusammensetzungen getestet.

Annealing-Temperatur der Wildtyp-Analyse

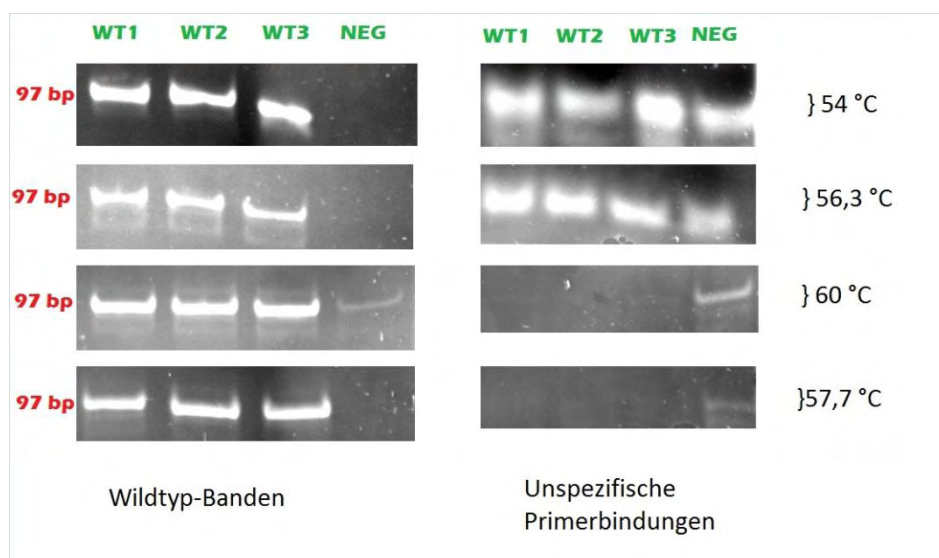


Abbildung 12: Getestet wurden drei Wildtyp-Proben (WT1, WT2, WT3) bei vier verschiedenen Annealing-Temperaturen (54°C, 56,3°C, 57,7°C, 60°C). Links sind die WT-Banden dargestellt, rechts die unspezifischen Primerbindungen.

Aus der Abbildung kann man gut erkennen, dass bei höherer Temperatur die Zielbande (97 bp) einerseits klarer wird und andererseits die unspezifischen Primerbindungen nachlassen. Mit diesem Teilversuch wurde also eindeutig bewiesen, dass eine Annealing-Temperatur von 58 bis 60 °C am idealsten für die Wildtyp-Analyse ist.

Unterhalb dieser Temperatur binden die Primer unspezifisch, was unerwünscht ist und vermieden werden sollte. Da die Negativ-Kontrolle bei 60°C eine leichte Bande zeigt, in dessen Geltasche wahrscheinlich etwas Probe von WT3 übergegangen ist, kann das Ergebnis des Gels nicht gewertet werden. Die Annealing-Temperatur für die Wildtyp-Analyse wird daher auf 58°C festgelegt, denn auch bei dieser Temperatur erscheinen starke Wildtyp-Banden und es sind kaum unspezifische Primerbindungen zu erkennen.

Annealing-Temperatur der Mutations-Analyse

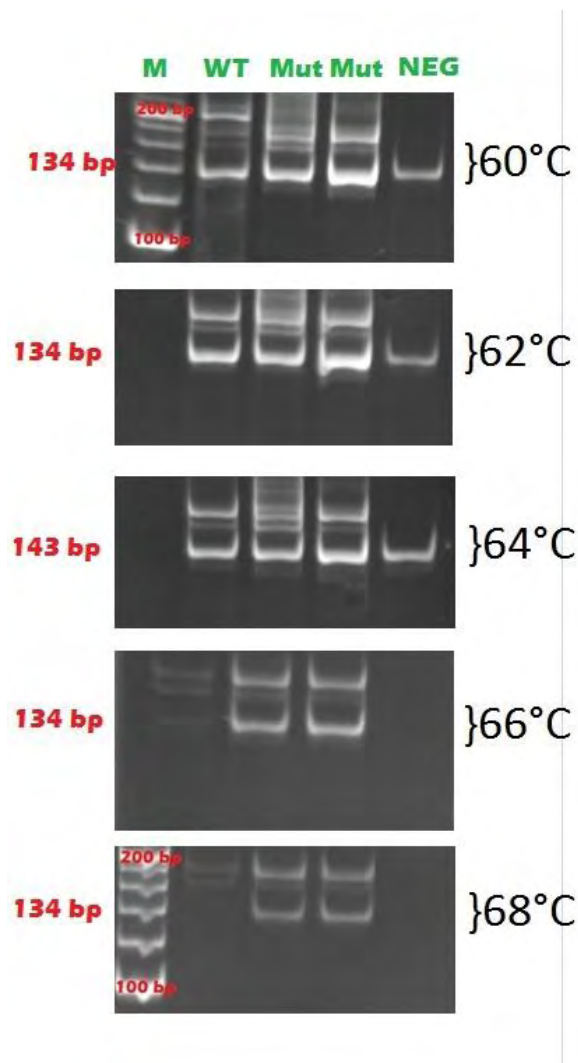


Abbildung 13: Getestet wurden eine Wildtyp-Probe (WT) und zwei Mutations-Proben (Mut) bei fünf verschiedenen Annealing-Temperaturen (60°C, 62°C, 64°C, 66°C, 68°C).

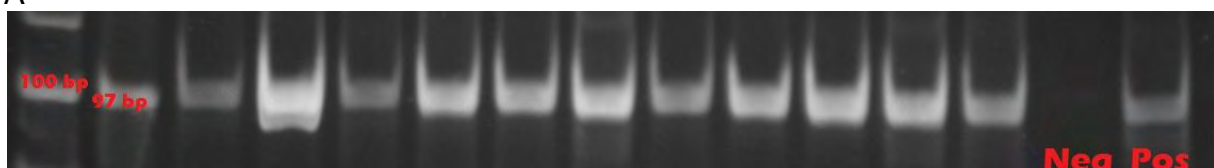
Bei der Wahl der Primer-Annealing-Temperatur für die Mutations-Analyse sieht man sehr deutlich, dass sie nicht zu niedrig sein darf, denn sonst bindet der *Rimut*-Primer unspezifisch und es sind auch bei Wildtypen Mutations-Banden (134bp) zu sehen. Sogar die Negativ-Kontrolle zeigt aus unerklärlichen Gründen bei einer zu niedrigen Temperatur eine Bande auf, obwohl für alle Proben ein einziger Mastermix hergestellt wurde. Bei der Temperatur von 68°C sieht das Gel am idealsten aus, denn sowohl bei der WT-Probe als auch bei der Negativ-Kontrolle ist keine 134 bp-Bande zu erkennen. Mit diesem Teilversuch wurde eindeutig bewiesen, dass die in der Publikation angegebene Annealing-Temperatur von 68°C ausschließlich bei der Mutationsanalyse Wirkung zeigt und demgemäß für alle weiteren Versuche übernommen wird.

Es ist nicht gelungen, eine gemeinsame Annealing-Temperatur zu finden, bei der sowohl Mutation als auch Wildtyp analysiert werden können. Das hat zur Folge, dass für die spätere Laboruntersuchung zwei unterschiedliche PCR-Programme verwendet werden müssen.

4.4. Optimierung der PCR-Durchführung

Bei den ersten Ergebnissen der PCR war es sehr auffällig, dass Negativ-Kontrollen in manchen Fällen die gesuchte Bande enthielten. Es sind hauptsächlich die Mutations-Analysen betroffen, eher weniger die Wildtyp-Analysen. Wie im vorher beschriebenen Abschnitt liegt es vor allem daran, dass der *Rimut*-Primer bei falscher Temperatur häufiger dazu neigt, unspezifisch zu binden. Demnach konnte das Ergebnis auf dem Gel nicht gewertet werden. Auch bei allen anderen Proben auf dem Gel war eine Bande zu erkennen, die alle in Größe und Form übereinstimmten. Der Fehler kann auf den Mastermix zurückgeführt werden, der mit DNA kontaminiert ist.

A



B

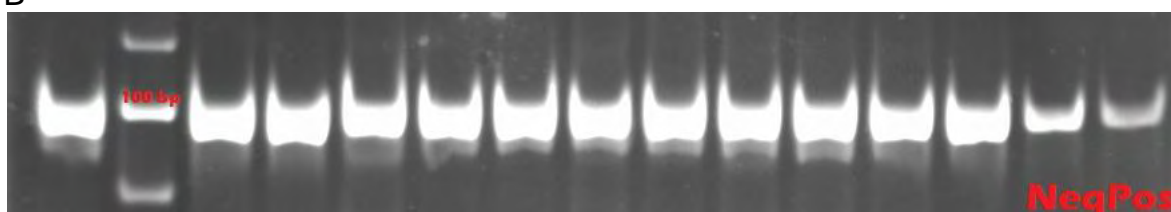


Abbildung 14: A. Wildtyp-Analyse. B. Mutations-Analyse.

Aus diesem Grund wurde beschlossen, dass bei allen Arbeiten unter der Sterilwerkbank mit Filterspitzen von der Firma *Sarstedt* durchgeführt werden um solche Kontaminationen vorzubeugen und eine bessere Sicherheit zu gewährleisten.

4.5. Optimierung der Analyse der PCR-Produkte

Laut der Publikation [8] werden die PCR-Produkte zur Analyse auf ein 2%-tiges Agarosegel aufgetragen. Agarosegele weisen jedoch größere Hohlräume auf und eignen sich daher zur Auftrennung von größeren PCR-Produkten. Da bei dieser Analyse maximal 200 bp-PCR-Produkte entstehen, werden statt Agarosegele Acrylamidgele verwendet. Grundsätzlich werden 10 %-tigelige Acrylamidgele gegossen, die dann ca. 1,5 Stunden laufen. Der Prozess der Gelelektrophorese wurde soweit optimiert, dass man statt den 10 %-tigeligen Acrylamidgelen 8 %-tigelige Gele verwendet, die ca. 70 Minuten laufen. So spart man zum einen Energie aber auch sehr viel Zeit.

4.6. Optimierung der Analyse von Proben mit wenig oder degradiertem DNA

Erhöhung der DNA-Menge bei der PCR. Probenlösungen mit geringer DANN-Konzentration können in größeren Mengen zum PCR-Ansatz gegeben werden. Dabei wird das Volumen des sterilen Wassers entsprechend reduziert, die Konzentration von Primer, dNTPs und Polymerase bleibt konstant.

Erhöhung der Primer-Menge. Die Primer-Menge von 1 μL kann auch auf 2 μL pro Ansatz erhöht werden. Das Volumen im Ansatz ändert sich unter diesen Umständen nur sehr gering und zieht dementsprechend ebenfalls zwingend eine Volumenänderung des sterilen Wassers mit sich. Durch die erhöhte Primer-Konzentration wird die Wahrscheinlichkeit der Bindung der Primer an die entsprechende DNA-Sequenz erhöht.

Erschaffung eines Templates. Etwas aufwändiger ist das Hintereinanderschalten von zwei PCR-Schritten. Im ersten Schritt wird mit Hilfe der Kontroll-Primer (*F1-R1*) ein Exon 15 Template erschaffen, welches im zweiten Schritt dann als DNA-Lösung für die Mutations- und Wildtypanalyse dient.

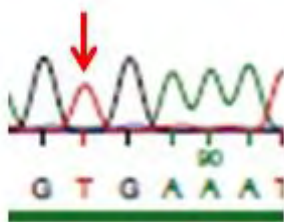
4.7. Statistische Analyse

Teil 2: Anwendung des Verfahrens

Im zweiten Teil der Arbeit soll die entwickelte Methode an Patientenproben von Patienten welche an pilozytischen Astrozytome leiden, getestet werden. Von insgesamt 69 Patientenproben konnten 31 analysiert werden. Bei dem Rest war entweder die DNA degradiert und so nicht analysierbar oder es war von Anfang an sehr wenig Gewebe vorhanden, sodass man nach der Probenvorbereitung eine sehr verdünnte DNA-Lösung erhält (<30 ng DNA/ μ L).

Die folgenden Abbildungen (*Abbildung 16 bis 18*) zeigen 36 getestete Proben, von denen bei 31 Proben ein Template mittels PCR amplifiziert werden konnte (grün in der Tabelle markiert). Bei den fünf in rot markierten Proben ist es nicht gelungen ein Template zu erschaffen. Wahrscheinlich handelt es sich dort um Proben mit degradiertem DNA. Mit dem Template werden anschließend eine Mutations- und eine Wildtyp-PCR durchgeführt. Für die Bestätigung der Ergebnisse wurde von einigen Proben das Template zur externen Sequenzierung geschickt. Die Spektralaufnahmen der Proben sind im Anhang zu finden. Für die Auswertung der Spektralaufnahmen muss lediglich analysiert werden, welche der beiden Basen (Thymin=Wildtyp, Adenin=Mutant) in der gesuchten Position eingebaut ist. Sind zwei übereinanderliegende Peaks vorhanden, also Thymin und Adenin, liegt eine Mutation vor. Ist nur der Thymin-Peak abgebildet, liegt keine V600E-Mutation vor.

A



B

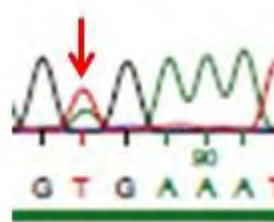
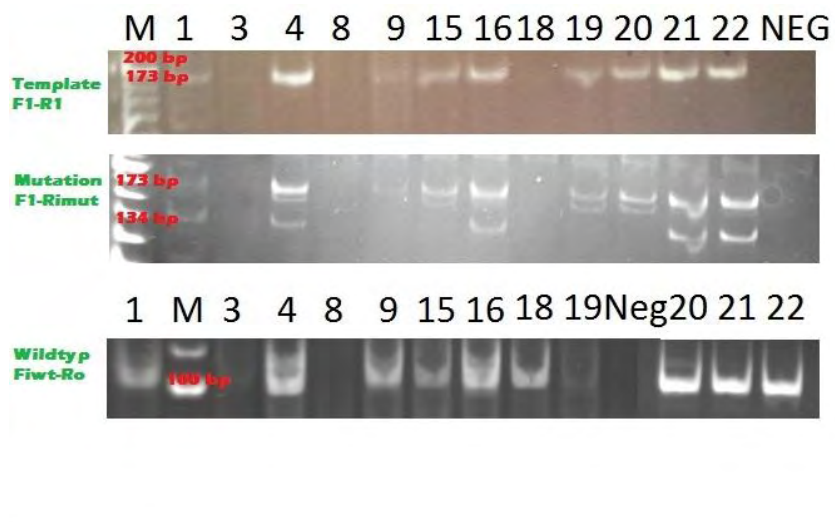


Abbildung 15: Beispiele für Spektralaufnahmen der Sequenzierung. A: Wildtyp. B: Mutant.

A

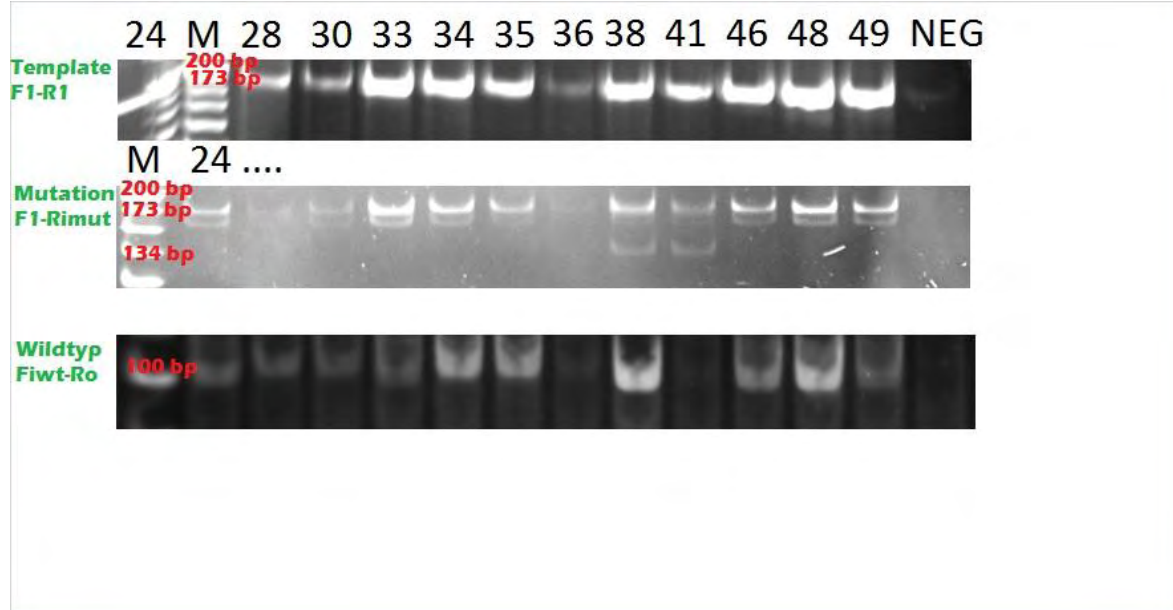


B

Proben Nr.	Template	Mutation	Wildtyp	Bestätigung durch Sequenzierung
1	+	+	+	Mutiert
3	-	-	-	
4	+	+	+	Mutiert
8	-	-	-	
9	+	-	+	Wildtyp
15	+	-	+	Wildtyp
16	+	+	+	Mutiert
18	-	-	-	
19	+	-	+	Wildtyp
20	+	-	+	Wildtyp
21	+	+	+	Mutiert
22	+	+	+	Mutiert

Abbildung 16: Darstellung des ersten Durchlaufs mit 12 Proben. A: Darstellung der Gele. B: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse.

A

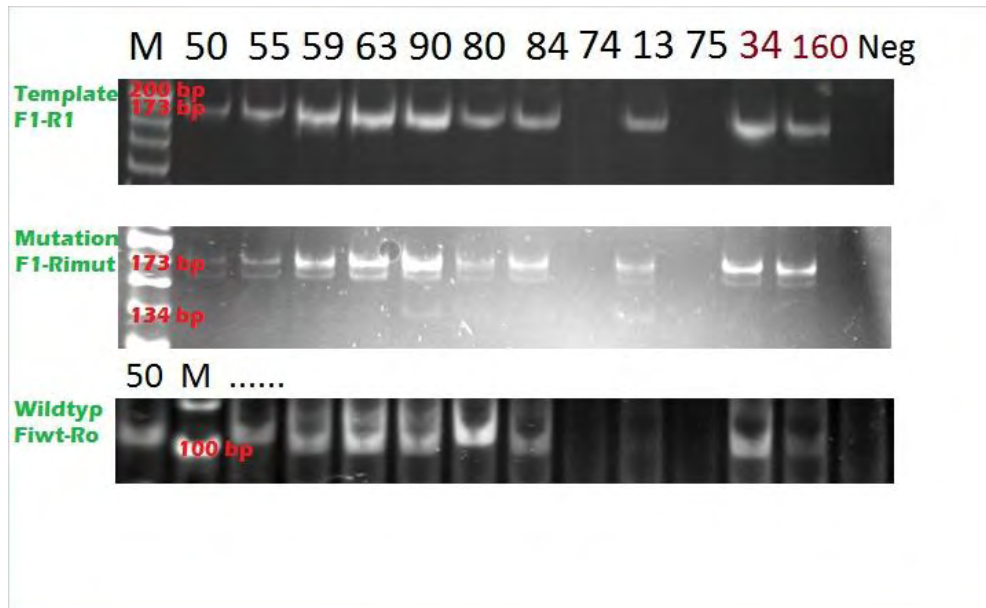


B

Proben Nr.	Template	Mutation	Wildtyp	Bestätigung durch Sequenzierung
24	+	-	+	-
28	+	-	+	-
30	+	-	+	-
33	+	-	+	Wildtyp
34	+	-	+	Wildtyp
35	+	-	+	-
36	+	-	+	-
38	+	+	+	Mutiert
41	+	+	+	-
46	+	+	+	-
48	+	-	+	Wildtyp
49	+	-	+	-

Abbildung 17: Darstellung des zweiten Durchlaufs mit 12 Proben. A: Darstellung der Gele. B: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse.

A



B

Proben Nr.	Template	Mutation	Wildtyp	Bestätigung durch Sequenzierung
50	+	-	+	Wildtyp
55	+	-	+	Wildtyp
59	+	-	+	Wildtyp
63	+	-	+	Wildtyp
90	+	+	+	Mutiert
80	+	-	+	-
84	+	-	+	Wildtyp
74	-	-	+	-
13	+	+	+	-
75	-	-	+	-
N34	+	-	+	Wildtyp
N160	+	-	+	Wildtyp

Abbildung 18: Darstellung des dritten Durchlaufs mit 12 Proben. A: Darstellung der Gele. B: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse.

In allen Fällen stimmt die Sequenzierungsanalyse mit der PCR-Analyse überein. Das Verfahren ist also für die Detektion der V600E-*BRAF*-Mutation geeignet.

Bei zehn von der 31 getesteten Proben konnte eine *BRAF*-Mutation nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass in den untersuchten Proben jeder dritte, der an pilozytischer Astrozytome leidet, eine *BRAF*-Mutation aufweist.

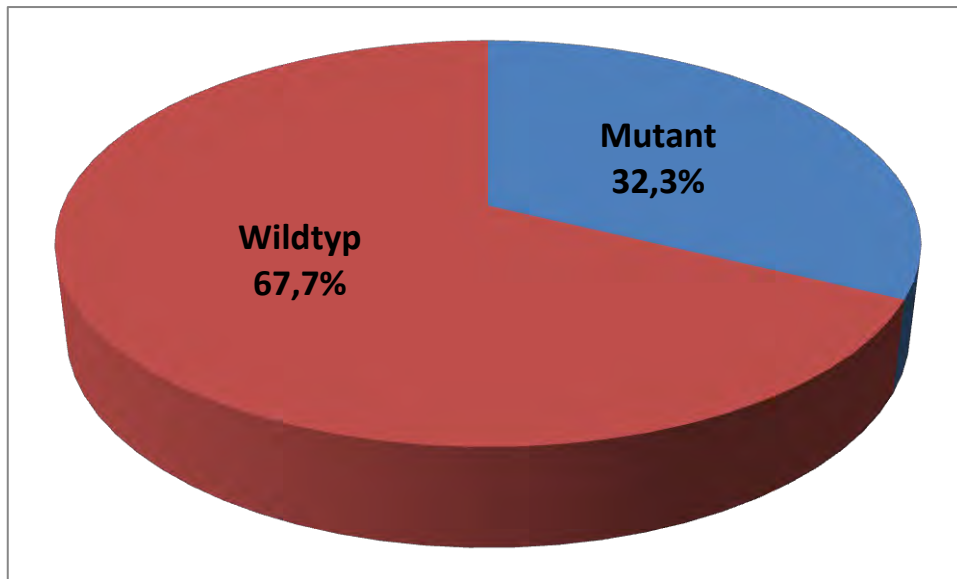


Abbildung 19: Graphische Darstellung der statistischen Analyse

5. Zusammenfassung und Ergebnisdiskussion

Das in der Publikation [8] beschriebene Verfahren zur Analyse von V600E-*BRAF*-Mutationen diente als Vorlage für diese Arbeit. Bis auf die Nutzung der mutations- und wildtypspezifischen Primer wurden alle restlichen Parameter für die Analyse optimiert. Denn entweder waren die Parameter so umständlich gewählt, dass sie sich nicht für die Routinearbeit im Labor eignen oder die gewählten Parameter haben sich bei den durchgeführten Versuchen nicht bewährt und mussten demnach neu definiert werden.

Die wichtigsten Optimierungsversuche sind bei der Wahl der Primer und der Temperatur gestartet worden. Die in der Publikation [8] um das Exon 15 gewählten Primer (Fo, Ro) haben vor allem bei den etwas älteren Patientenproben eine sehr niedrige Bindungsaffinität gezeigt, wobei die neu eingeführten Primer (F1, R1) eine stärkere Affinität aufweisen.

Auch bei der Wahl der Temperatur konnte gezeigt werden, dass die zwei spezifisch bindenden Primer sehr unterschiedliche Schmelztemperaturen aufweisen (56,6°C, 63°C) und dementsprechend nur bei zwei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen richtig binden können, ohne dabei unspezifische Bindungen eingehen zu müssen. Es sollte bedacht werden, dass es sich bei der V600E-Mutation um eine Punktmutation handelt, was die Analyse schwieriger macht. Das Verfahren muss so exakt und präzise etabliert werden, dass es sensibel genug auf den Austausch dieser einzelnen Base reagiert. Die exakte Temperaturwahl ist daher vor allem bei der Bindung des mutationsspezifischen Primer eine wichtige Voraussetzung, denn dieser Primer scheint eine sehr hohe Neigung zur unspezifischen Bindung aufzuweisen.

Das Ziel, beide Analysen mit einem einzigen PCR-Programm durchführen zu können, konnte nicht erfüllt. Es muss also in Zukunft ein PCR-Programm pro Analyse bestehen, das heißt ein Programm mit der Annealing-Temperatur von 58°C für die Wildtyp-Analyse und ein weiteres Programm mit der Annealing-Temperatur von 68°C für die Mutations-Analyse. Dies wiederum bedeutet, dass zwei PCR-Maschinen parallel laufen müssen, was mehr Platz und Energie verbraucht.

Die Wildtyp-Analyse scheint auf den ersten Blick überflüssig zu sein, denn schließlich muss jede Probe eine Wildtyp-Bande aufweisen. Beim Entfernen des Gewebes wird immer auch gesundes Gewebe mit entfernt. Trotzdem sollte man die Wildtyp-Analyse parallel zur Mutations-Analyse durchführen, denn wenn tatsächlich keine Mutations-spezifische Bande auf dem Gel vorhanden ist, muss man im Gegenzug beweisen können, dass die Probe wenigstens eine Wildtyp-Bande aufweist und das Fehlen der Bande somit nicht an der DNA der Probe liegt. Die DNA der Probe könnte zum Beispiel degradiert, verschmutzt oder verdünnt sein.

Bei allen zusätzlichen Optimierungsversuchen hat man versucht, sich so weit wie möglich an die bisherigen Verfahren des Instituts zu orientieren, um somit ein standardisiertes Verfahren zu schaffen. Das Pipettierschema ist einfach. Für die Analyse soll ein Acrylamid-Gel statt einem Agarose-Gel eingesetzt werden, weil es sich in der Vergangenheit vor allem bei kleinen PCR-Produkten bewährt hat. Zur Vorbeugung von Kontaminationen soll unter der Sterilwerkbank gearbeitet werden. Zumindestens der Ansatz des Mastermix's und die Zugabe in die einzelnen PCR-

Reaktionsgefäße sollte unter der Sterilwerkbank erfolgen. Die Hinzugabe der DNA-Lösung kann auch außerhalb der Sterilwerkbank erfolgen.

Während der Arbeit mit den älteren Proben ist vor allem aufgefallen, dass die DNA dieser Proben in den meisten Fällen sehr schwer analysierbar war. Grundsätzlich ist aber Gewebe-DNA, das in Paraffin eingebettet ist, sehr stabil und sollte auch noch nach Jahren untersuchbar sein. Deshalb wurde für alle Proben, welche für den zweiten Teil der Arbeit relevant sind, die Zwei-PCR-Methode gewählt. Es wurde im ersten Schritt ein Template erschaffen, somit eine Exon 15-Aufkonzentrierung vorgenommen, welche dann im zweiten Schritt auf eine Mutation und Wildtyp getestet wird.

Zur Etablierung des Verfahrens standen relativ frische Proben mit viel DNA zur Verfügung. Diese zeigten spezifische Banden bei der direkten Mutations- oder Wildtypanalyse.

Die in Zukunft antreffenden Proben könnten ohne Template-Amplifizierung direkt auf Mutation und Wildtyp getestet werden. Voraussetzung ist das erstens die Proben nicht sehr alt sind und zweitens genügend Gewebe geliefert wird. Ansonsten empfiehlt es sich zwei PCR-Schritte zu wählen.

Das Untersuchen der Proben für die Statistik hatte wesentliche Vorteile in sich: man konnte das bisher etablierte Verfahren anwenden, Schwierigkeiten raus filtern und somit das Verfahren immer weiter optimieren. Aufgrund des Alters der Proben war es nicht möglich, alle erhaltenen Proben zu analysieren. Nur 31 von den 69 Proben konnten analysiert werden. 10 von den analysierten Proben zeigen eine V600E-*BRAF*-Mutation, was bedeuten würde, dass jeder Dritte, der an pilozytischer Astrozytome erkrankt ist, ebenfalls auch eine Mutation im *BRAF*-Gen hat. In der Realität liegt jedoch die Prozentquote bei 10-15%. Da das Ergebnis der statistischen Analyse in allen Fällen mit der externen Sequenzierung bestätigt wurde, liegt die Abweichung der Prozentquote nicht an dem etablierten Verfahren, sondern an der Anzahl der untersuchten Proben. 31 Untersuchungen sind zu wenig, um eine ausschlaggebende Statistik aufzustellen.

In der Publikation von Horbinski et al. [17] ist bsp. mit der Untersuchung von 147 Patientenproben eine Statistik über den Entstehungsort von genetischen Veränderungen im Hirn bei pilozytischer Astrozytome gemacht worden.

Der Unterschied der Probenzahl zur Aufstellung der Statistiken ist groß, und erklärt somit die Abweichung der Prozentquote bei der durchgeführten statistischen Analyse und der in der Literatur zu findenden Werte. Man hätte mehr Proben untersuchen müssen, um eine aussagekräftige Statistik aufzustellen. Leider war dies jedoch wegen der mangelnden DNA-Qualität von vielen Proben nicht möglich.

6. Ausblick

Anhand dieser Abschlussarbeit ist es gelungen, für das Diagnostikzentrum des Instituts der Neuropathologie eine sensitive Methode zur V600E-*BRAF*-Mutation zu etablieren. Die zwei folgenden Abbildungen zeigen die Analysen im Fließbild mit allen wichtigen Einzelheiten.

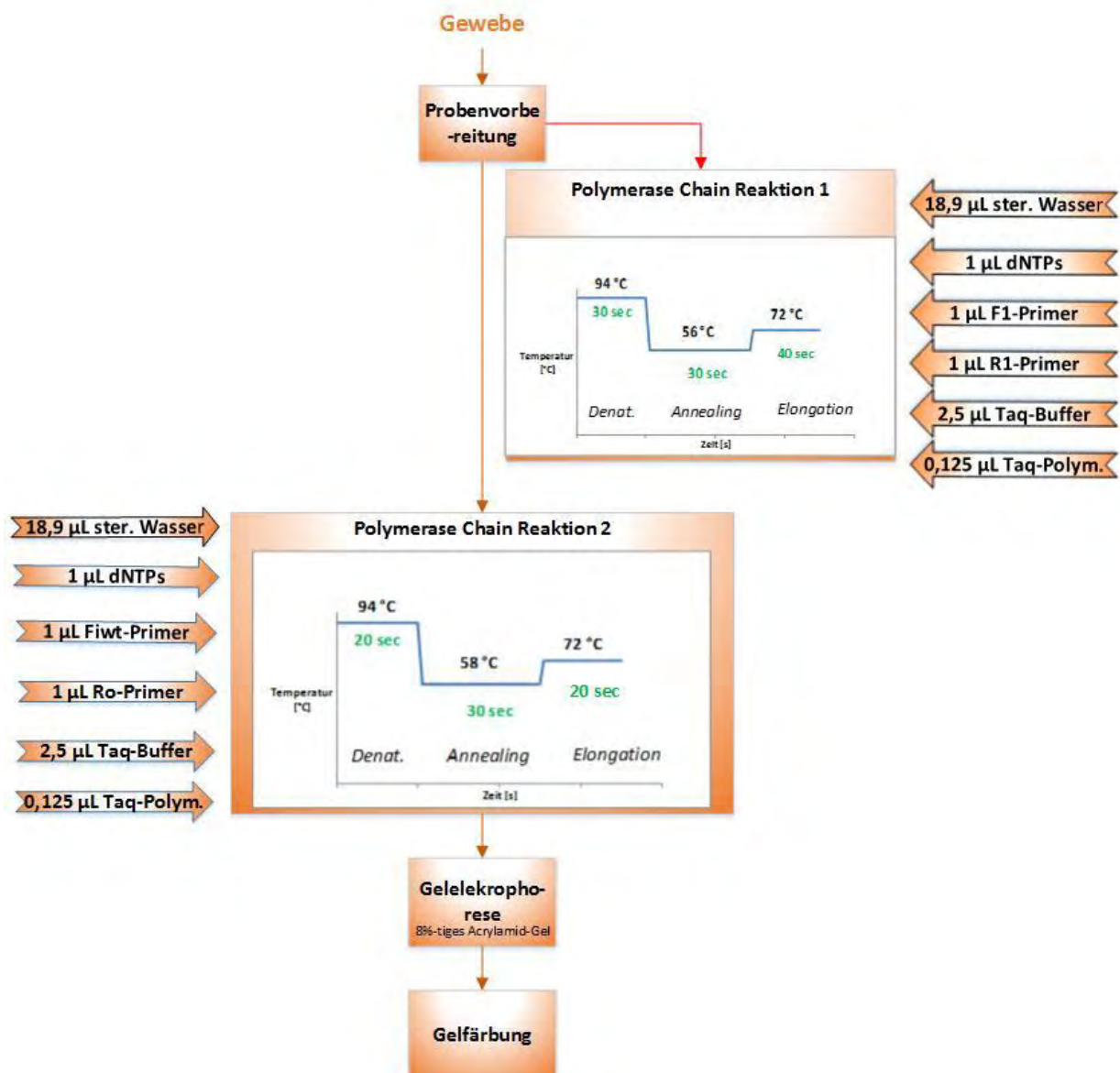


Abbildung 20: Flussdiagramm für die Wildtyp-Analyse.

Gewonnene gen. DNA kann entweder direkt auf Wildtyp getestet werden (PCR2) oder man erschafft vorher ein Exon 15-Template (PCR1) und untersucht dieses dann auf Wildtyp (PCR2). PCR-Programm und Mastermix-Ansatz können der Grafik entnommen werden. Anschließend erfolgt eine Gelelektrophorese mit Gelfärbung.

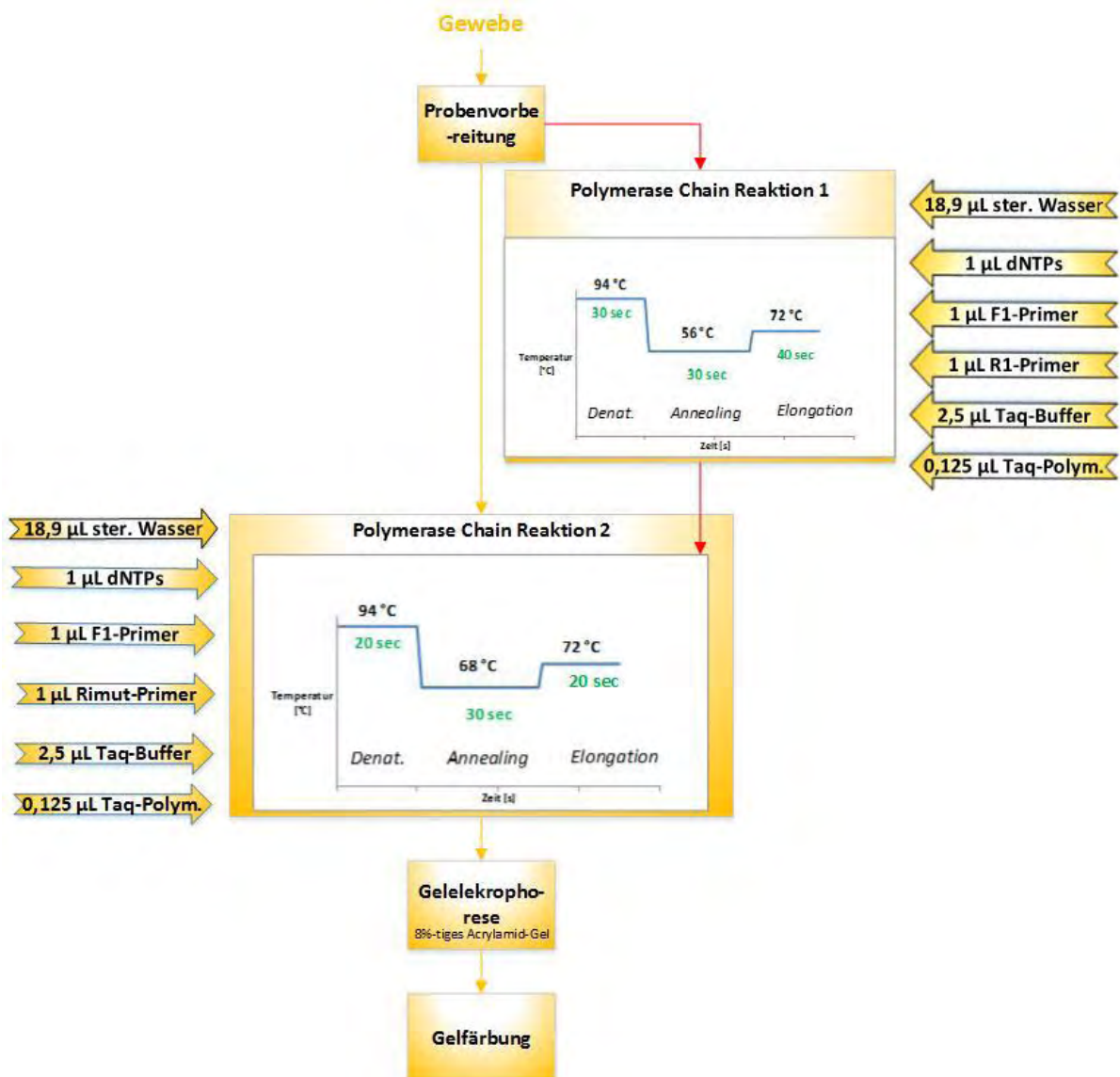


Abbildung 21: Flussdiagramm für die V600E-Mutations-Analyse. Gewonnene gen. DNA kann entweder direkt auf Mutation getestet werden (PCR2) oder man erschafft vorher ein Exon 15-Template (PCR1) und untersucht dieses dann auf Wildtyp (PCR2). PCR-Programm und Mastermix-Ansatz können der Grafik entnommen werden. Anschließend erfolgt eine Gelelektrophorese mit Gelfärbung

7. Literaturverzeichnis

- [1] Homepage des Institut für Neuropathologie des UKEs, <http://www.uke.de/institute/neuropathologie/>
- [2] PROF. DR. KLAUS ZANG, „*Entwicklungswege bei Gliomen*“, Universitätsklinikum des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, 2002
- [3] NORBERT HOSTEN, THOMAS LIEBIG, „*Computertomographie von Kopf und Wirbelsäure*“, Georg Thieme Verlag, 2007, Seite 135-137
- [4] CANDECE L. GLADSON, RICHARD A. PRAYSON, AND WEI (MICHAEL) LIU, „*The Pathobiology of Glioma Tumors*“, Annu Rev Pathol. 2010
- [5] TONN JÖRG-CHRISTIAN ET AL: „*Oncology of CNS Tumors*“, Springer Verlag 2010
- [6] PROF. DR. MED. GUIDO REIFENBERGER, DR. MED. BASTIAN MALZKORN, PRIV.-DOZ. DR. MED. JÖRG FELSBERG, „*Bedeutung neuer Biomarker für Gliompatienten*“, Univ. Düsseldorf, Institut für Neuropathologie, 2013, Kapitel: BRAF-Veränderungen
- [7] Homepage der Neuropathologie der medizinischen Universität München, „*BRAF-V600 Mutationsstatus*“, 2014
- [8] TIANGUI HUANG, JIAN ZHUGE, WENYONG W ZHANG, „*Sensitive detection of BRAF V600E mutation by Amplification Refractory Mutation System*“, Biomarker Research, 2013
- [9] G. SCHINDLER, D. CAPPER ET AL. „*Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma*“, Springer Verlag, 2011
- [10] CRAIG HORBINSKI, „*To BRAF or Not to BRAF: Is That Even a Question Anymore?*“, Neuropathol Exp Neurol, 2013
- [11] RENATE LÜLLMANN-RAUCH, FRIEDRICH PAULSEN, „*Taschenbuch Histologie*“, Georg Thieme Verlag, 2012, Seite 27
- [12] Firma ROTH, „*Gebrauchsanweisung der Proteinase K*“, 2014
- [13] GERHARD RICHTER ET AL: „*Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken ; 19 Tabellen*“, Georg Thieme Verlag, Seite 142
- [14] JOHANNES REGENBOGEN, „*Herstellung und Analyse normalisierter cDNA-Banken*“, Herbert Utz Verlag, 1997, Seite 30-31

- [15] TOM STRACHAN, ANDREW READ, „ *Human Molecular Genetics*“, published by Garland Science, 2010, chapter 6
- [16] PROF. DR. MANFRED KRÖGER, DR. KAI MEYER-ROGGE, „*Die Gelelektrophorese: Einleitung*“, ChemgaPedia, 2014
- [17] CRAIG HORBINSKI ET AL.: „*Association of molecular alterations, including BRAF, with biology and outcome in pilocystic astrocytomas*“, Acta Neuropathol, 2010

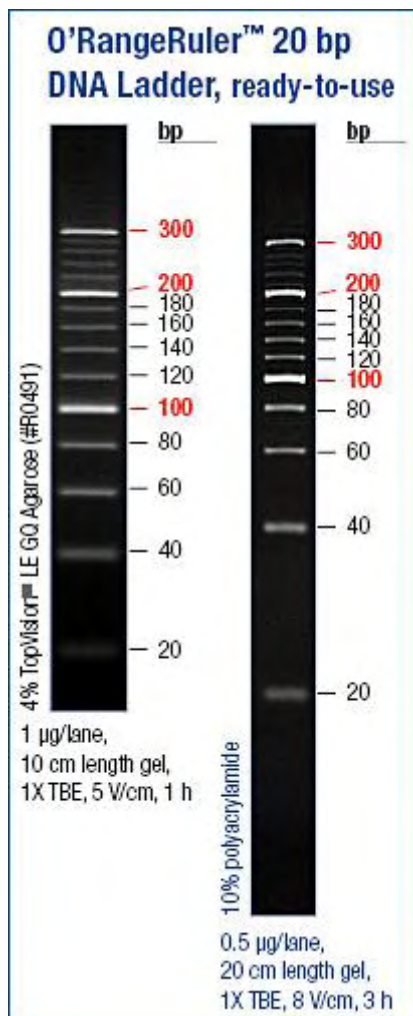
Anhänge

Technische Daten der verwendeten Primer

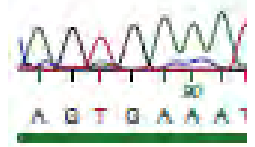
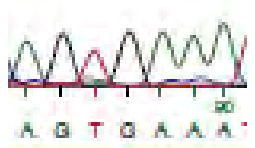
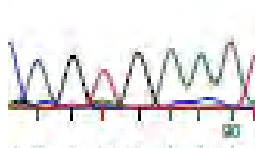
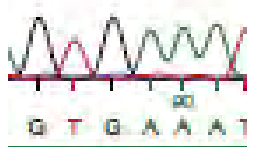
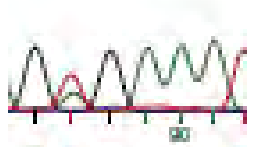
Oligo Name	Oligo #	Ler	Pur	Scale	MW	Tm*	µg/OD	OD	µg	nmol	Epsilon 1/(mMcm)	Dime	2ndry	GC %	µl for 100µM	Sequence(5'-3')
BRAF Fo	8016310431-000010	25	RP1	0.025	7601	62.1	33.2	10.7	355.3	45.7	228.9	No	Very Weak	40	467	CTCTTCATAATGCTTGCTGTGATAG
BRAF Ro	8016310431-000020	21	RP1	0.025	5264	62.2	33.3	7.6	253.2	40.4	188	No	None	47.6	404	GCCTCAATTCTTACCATCCAC
BRAF Fwet	8016310431-000030	22	RP1	0.025	6775	56.6	32.1	11.2	360.4	53.2	210.5	No	None	40.9	532	GTGATTTTGGTCTAGCTACAGT
BRAF Rimut	8016310431-000040	20	RP1	0.025	5991	63.0	33.4	6.9	230.8	38.5	179.1	No	Weak	50	385	CCCACTGCATCGAGATTCT

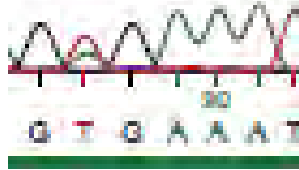

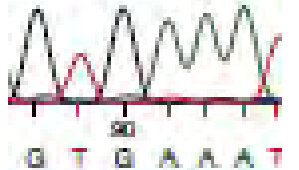
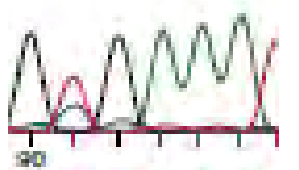
Oligo Name	Oligo #	Ler	Pur	Scale	MW	Tm*	µg/OD	OD	µg	nmol	Epsilon 1/(mMcm)	Dime	2ndry	GC %	µl for 100µM	Sequence(5'-3')
BRAF-F1	8016261950-000010	22	RP1	0.025	6793	63.1	31.7	5.9	187.5	27.6	213.7	No	None	40.9	276	TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG
BRAF-F2	8016261950-000020	21	RP1	0.025	6383	51.4	30.7	6.8	209.0	32.7	207.6	No	Weak	28.5	327	ATATATTTCTTCATGAAGACC
BRAF-R1	8016261950-000030	20	RP1	0.025	6092	63.4	29.8	4.8	143.1	23.4	204.3	No	Weak	45	234	CCACAAAATGGATCCAGACA

Zusammensetzung des Markers



SequenzierungsergebnisseProbenNRSpektralaufnahme der Sequenzierung

<u>N34</u>	
<u>N160</u>	
<u>7</u>	
<u>20</u>	
<u>21</u>	

<u>22</u>	
<u>33</u>	
<u>34</u>	
<u>38</u>	
<u>48</u>	