

Molekulargenetische Analysen zur Etablierung eines Progressionsmodells des Pankreaskarzinoms

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

biologischen Fakultät

der

Universität Osnabrück

vorgelegt von

Hamid Galehdari

aus

Abadan/Iran

Osnabrück 2000

Angefertigt mit Genehmigung der biologischen Fakultät der Universität Osnabrück

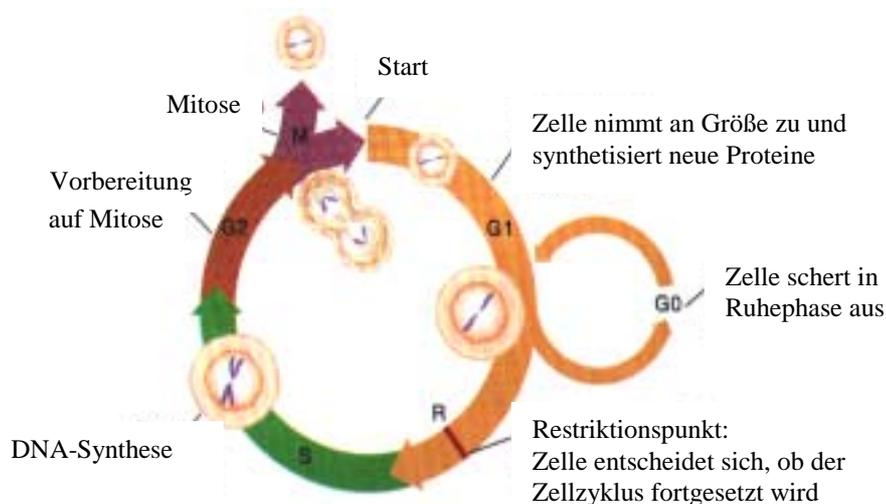
- 1. Referent: Prof. Dr. Gunar Jeserich**
- 2. Referent: Priv. Doz. Dr. Stephan A. Hahn**

1.	EINLEITUNG.....	1
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1	HISTOPATHOLOGISCHES MATERIAL	9
2.2	TUMORDIFFERENZIERUNG	9
2.3	MIKRODISSEKTION DER LÄSIONEN	10
2.4	WHOLE GENOME AMPLIFICATION	10
2.4.1	PRINZIP VON DOP-PCR.	11
2.4.2	DURCHFÜHRUNG DER REAKTION	12
2.5	MIKROSATELLITEN-PCR	12
2.6	MUTATIONSANALYSE	19
2.6.1	RFLP (RSTRIKTIONFRAGMENT -LÄNGENPOLYMORPHISMUS) -PCR	19
2.6.2	ASO (ALLELSPEZIFISCHES OLIGONUKLEOTID).....	21
2.6.2.1	DOT-BLOT.....	22
2.6.2.2	SOUTHERN-BLOT.....	22
2.6.3	SSCP (<i>SINGLE STRAND CONFORMATIONAL POLYMORPHISM</i>).....	23
2.7	DIREKTE SEQUENZIERUNG VON PCR-PRODUKTEN.....	24
2.8	ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA.....	25
2.9	PAGE (POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE).....	25
2.10	SILBERFÄRBUNG.....	26
2.11	IMMUNHISTOCHEMIE.....	26
2.11.1	DIE APAAP-METHODE.....	26
2.11.1.1	AUSFÜHRUNG.....	27
2.11.1.2	APAAP-REAGENZIE.....	28
2.11.2	DAS VECTASTAIN ABC-SYSTEM.....	29
2.11.2.1	AUSFÜHRUNG.....	29
3.	ERGEBNISSE	31
3.1	EVALUIERUNG DER DOP-PCR.....	31
3.2	CHROMOSOMALE DELETIONEN IN DEN GANGEPITHELIEN.....	36
3.3	AUSWERTUNG DER LOH-DATEN.....	45
3.3.1	KLONALE PROGRESSION DER EPITHELZELLEN.....	46
3.3.2	AUSFALLSRATE UND ARTEFAKTE.....	47
3.4	KORRELATION DES HISTOPATHOLOGISCHEN PROGRESSIONSMODELLS MIT DER LOH-FREQUENZ.....	49
3.5	AKKUMULATIVE INAKTIVIERUNG DER TUMORSUPPRESSORGENE.....	50

3.6	NACHWEIS VON DPC4- UND TP53-GENPRODUKTEN MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE.....	53
3.7	MUTATIONSANALYSE VOM K-RAS-GEN.....	56
4.	DISKUSSION	61
4.1	EPIDEMIOLOGIE DES PANKREASKREBS.....	61
4.2	HISTOPATHOLOGIE DER DUKTALEN GANGEPIHELIIEN.....	62
4.3	NACHWEIS CHROMOSOMALER DELETION DURCH MIKROSATELLITEN-MARKER UND DEREN BEDEUTUNG IN DER TUMORPATHOGENESE.....	63
4.4	<i>IN VITRO</i> -VERMEHRUNG DES GENOMS.....	65
4.5	ROLLE VOM P53-GEN BEI DER PROGRESSION DER GANGEPIHELIIEN..	67
4.6	INVOLVIERUNG DER SUPPRESSORGENE P16 UND DPC4 IN DER TUMORENTWICKLUNG.....	69
4.7	ONKOGENE AKTIVIERUNG DES K-RAS-GENS IN PRENEOPLASTISCHEN LÄSIONEN.....	71
4.8	SCHRITTWEISE ENTSTEHUNG DES PANKREASKARZINOMS.....	72
4.9	WEITERE KENNTNISSE AUS DER PANKREAS-FORSCHUNG.....	74
4.10	ZUKUNFTSPERSPEKTIVE.....	74
5.	ZUSAMMENFASSUNG	76
6.	LITERATUR	78
7.	DANKSAGUNG	97
8.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	98
9.	LEBENS LAUF	99

1. EINLEITUNG

Das Wachstum eines Gewebes oder Organs vollzieht sich durch Zunahme der Zellzahl und/oder der Zellgröße. Im Laufe der Entwicklung gehen aus einer einzigen menschlichen Keimzelle 10^{15} Zellen hervor. Nach dem Reifeprozess bleibt die Zellzahl konstant. Jedoch geht die Zellteilung bei einigen Zellen wie beispielsweise den Zellen des Gastrointestinaltrakt, der Haut und des Knochenmarks weiter. Täglich müssen abgestorbene Zellen durch neue ersetzt werden. Dieser Erneuerungsprozess unterliegt einem sehr strengen Zellteilungsmechanismus (Zellzyklus), dessen Störung u.a. ein unkontrolliertes Wachstum (Tumorbildung) zufolge



haben kann. Krebs ist keine einheitliche Krankheit, sondern ein Oberbegriff für verschiedene Formen maligner Erkrankungen. Nahezu jedes Gewebe unseres Körpers ist in der Lage, Tumoren zu bilden, oft sogar unterschiedliche Typen. So ist es auch beim Pankreaskarzinom, dessen Tumoren nach Zelltyp und -funktion klassifiziert werden. Man unterscheidet z.B. zwischen Sarkomen (seltene Bindegewebstumoren) und Karzinomen, die aus Epithelzellen hervorgehen. Letztere teilen sich wiederum in exokrine sowie endokrine Tumoren. Das am häufigsten auftretende Karzinom der Bauchspeicheldrüse weist eine Differenzierung entsprechend den exokrinen Gangepithelzellen auf. Plattenepithel- und Azinuszellkarzinome werden sehr selten beobachtet (Cubilla et al., 1984; Eskelinen et al., 1992). Durch tumorbiologische Erkenntnisse aus der letzten Zeit weiß man heute, daß Krebs im Prinzip genetisch bedingt ist. Unabhängige genetische Veränderungen verleihen den betroffenen Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil. Die Akkumulation mehrerer Genveränderungen und möglicherweise auch deren zeitliche Abfolge sind wesentliche Grundbedingungen für die maligne Transformation (Fearon et al., 1990).

Zwei Klassen von Genen, die zusammen nur einen kleinen Anteil der gesamten Ausstattung einer Zelle ausmachen, sind wesentlich für Krebsentstehung verantwortlich: Onkogene¹ und Tumorsuppressorgene.



Abb. 1.1: Ein Karyotyp des Pankreaskarzinoms (Brat et al., 1997) zeigt häufig einen Verlust des genetischen Materials auf fast jedem Chromosom. Das Phänomen der genetischen Instabilität wird auch bei anderen Krebsarten beobachtet. Bei Pankreaskarzinomen treten die Verluste in den Chromosomen 9, 17 und 18 sehr häufig auf chromosomale Regionen auf, auf denen wachstumsregulierende Gene (Tumorsuppressorgene) lokalisiert sind.

Onkogene:

Onkogene sind aktivierte Formen zellulärer Proto-Onkogene, die die Zellproliferation und – Differenzierung fördern. K-ras ist beispielsweise ein Proto-Onkogen und Mitglied der ras-Genfamilie². K-ras und seine Homologe kodieren für ein 21 KD Protein. Diese Proteine sind an der Signalübertragung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren beteiligt (Barbacid, 1987). Ein extrazelluläres Signal bewirkt über GAP (*GTPase activating protein*) die Bindung von GTP an das Ras-Protein. Der GTP-Ras-Komplex leitet das Signal in der Zelle weiter. Da die Ras-Proteine über eine GTPase-Aktivität verfügen, wird der aktive GTP-Ras-Komplex in inaktives GDP-Ras umgewandelt und die Signalübertragung ist somit beendet. Mutationen im K-ras-Gen wirken dominant (d.h. die onkogene Aktivierung bedarf nur der Veränderung in

¹ Man unterscheidet fünf funktionelle Hauptgruppen von Onkogenen: 1) sezernierte Wachstumsfaktoren. 2) Zelloberflächerezeptoren. 3) Komponente des intrazellulären Signalübertragungssystems. 4) DNA-bindende Transkriptionsfaktoren. 5) Bestandteile der Kaskade von Cyclinen, cyclinabhängigen Kinasen und Kinaseinhibitoren, die den Fortgang des Zellzyklus steuern.

² Drei Mitglieder dieser Genfamilie sind: zelluläres K-ras, homolog zu dem viralen Gegenstück v-K-ras (Kirsten murine sarcoma virus), H-ras mit Homologie zu Harvey murine sarcoma virus und eine weitere Spleißform von H-ras, bekannt als N-ras.

einer der beiden Genkopien) und beschränken sich in der Regel auf somatische Zellen. Das für K-ras Protein codierende Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 lokalisiert, dessen Produkt im Cytosol synthetisiert, nach der Translation modifiziert und in seinen Zielort (Innenseite der Plasmamembran) befördert wird.

In einer Reihe von Tumoren findet man häufig Punktmutationen im K-ras-Gen. Dabei treten Mutationen besonders häufig im Kodon 12 (seltener in den Kodons 13 und 61) auf (Bos et al., 1987; Capella et al., 1991; Hruban et al., 1993). Durch Aminosäuresubstitutionen im Kodon 12 verliert das Ras-Protein seine GTPase-Aktivität, was zu einer übermäßigen zellulären Stimulation führt. Im duktalem Pankreaskarzinom beobachtete man eine nahezu 100%ige Mutationsrate im K-ras-Gen (DiGiuseppe et al., 1994). Bei anderen Karzinomen (Dickdarm-, Lungen-, Brust- sowie Blasenkrebs) wurde im Vergleich über eine niedrigere Mutationsrate berichtet (ca. 50%).

Tumorsuppressorgene:

Ein weiteres Merkmal der entarteten Krebszellen ist die Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene. Ihre Produkte sind in normalen Zellen wirksame Antagonisten gegen proliferationsinduzierende Proteine. Im Unterschied zu Onkogenen bedarf der Funktionsverlust bei Tumorsuppressorgen der Inaktivierung beider Allele. Diese Inaktivierung geschieht in den Krebszellen in der Regel durch eine Mutation in einem Allel, gefolgt vom Verlust des zweiten Allels in Form einer Deletion. Selten geschieht auch der Verlust beider Allele ausschließlich durch chromosomale Stückverluste.

Zu den wichtigsten und gut charakterisierten Tumorsuppressorgen gehört das *TP53*-Gen, das auf dem kurzem Arm des Chromosoms 17 lokalisiert ist. Mehr als 50% aller Tumorarten weisen einen Defekt in diesem Gen auf (Barton et al., 1991; Levine et al., 1994). Das Produkt vom *TP53* fungiert in einer normalen Zelle durch Bildung eines Tetramer-Moleküls als Transkriptionsfaktor (Vogelstein, 1992) und steuert dadurch die Transkription weiterer Gene³, die letztendlich wachstumshemmend wirken (Chen et al., 1990). Seine weitere Funktion besteht in der Einleitung des programmierten Zelltods, der Apoptose. Dieser Mechanismus tritt u.a. dann auf, wenn die Zelle DNA-Schäden ausgebildet hat, die irreparabel sind (Jacks et al., 1996). Eine Besonderheit dieses Gens ist neben seiner suppressiven Eigenschaft die

³ Zu diesen p53-abhängigen-Genen gehören zum Beispiel p21 (inhibiert einige cyclin-cyclin-abhängige Kinasen, hindert den Zellzyklus); Bax (Mitglied der Bcl2-Familie und leitet die Apoptose) und GADD45 (ist in dem DNA-Reparatursystem involviert).

ebenfalls postulierte onkogene Aktivität (Levine et al., 1991). Das mutierte Protein ist in der Lage mit dem Wildtyp zu interagieren. Dieser Komplex ist jedoch nicht mehr fähig, die Promotorregion des Zielgens zu aktivieren (dominant negativ).

Ein zweites Tumorsuppressorgen, das in die Tumorigenese der Bauchspeicheldrüse verwickelt zu sein scheint, ist das *p16*-Gen (lokalisiert auf dem Chromosom 9p21). Die Inaktivierung dieses Gens wurde in 96% der Pankreaskarzinome beobachtet, wobei sich der Funktionsverlust in 43% der Fälle auf homozygote Deletion, d.h. auf Verlust beider Genkopien bezieht. Über 40% der Inaktivierung geschieht in diesem Gen durch Deletion in einer und Punktmutation in der anderen Genkopie (Schutte et al., 1997). Eine weitere Inaktivierungsform dieses Gens besteht in der Hypermethylierung seiner Promotorregion (Merlo et al., 1995). Dadurch kann der Transkriptionsfaktor nicht an diese Region binden und somit ist die Genexpression unterbunden. Diese Form des Expressionsverlustes wurde in 10% der Karzinome beobachtet (Reed et al., 1996; Schutte et al., 1997). Mutationen im *p16*-Gen wurden zuerst in Melanomen entdeckt. Kurze Zeit später hat man bei den anderen Tumorarten Punktmutationen in diesem Gen nachweisen können. Daher wird dieses Gen in der Literatur auch als *MTS1* (*Multiple tumor suppressorgene locus 1*) bezeichnet. Das P16-Gen codiert für ein Protein, das durch Bindung an die zellteilungsregulierenden bzw. Zellzyklus-Proteine (Cycline und cyclin-abhängige Kinasen) die Fortsetzung der Mitose inhibiert (Kamb et al., 1994).

Ein weiteres Suppressorgen wurde kürzlich im Pankreaskarzinom entdeckt, das aufgrund seiner häufigen Inaktivierung in Pankreastumoren als ein tumorspezifisches Suppressorgen postuliert wird (Schutte et al., 1996). Dieses Gen, das *DPC4*-Gen (*deleted in pancreas carcinoma locus 4*) genannt wurde (Hahn et al., 1997), liegt auf Chromosom 18q21.1⁴ und weist eine 75-85%ige Homologie zum Drosophila-Gen *Mad* (*mothers against dpp*) auf, welches in der Frühentwicklung der Fliege essentiell ist. Daher wird *DPC4* auch *Smad4* genannt (Derynck et al., 1996). Funktionell ist dieses Gen in der *TGFβ* (*Transforming growth factor*) vermittelten Signalübertragung beteiligt (Niehrs et al., 1996; Riggins et al., 1996). Durch Aktivierung des *TGFβ*-Rezeptorkomplexes Typ I/II mittels eines Liganden der *TGFβ*-Familie wird ein Rezeptor-reguliertes Smad (z.B. Smad 1 oder Smad 2) im Cytoplasma phosphoryliert. Dies führt zur Konformationsänderung des Rezeptor-Smad-Komplex, was die Bindung an das *DPC4*-Proteins ermöglicht. Daraufhin wird dieser Komplex in den Zellkern

⁴ Jedes Chromosom wird in zwei kurze und lange Arme aufgeteilt. Konventionell wird der kurze Arm mit ‚p‘ und der lange mit ‚q‘ bezeichnet.

befördert. Dort induziert es die transkriptionelle Aktivierung weiterer Gene (Derynck et al., 1996). *Smad4* ist in der Hälfte aller Pankreaskarzinome inaktiviert (Hahn et al., 1997). Keimbahnmutationen in diesem Gen wurden bei der familiären Polyposis gefunden, ein Syndrom, das mit einem erhöhten Kolonkarzinomrisiko einhergeht (Su et al., 1999). In den anderen Organen spielt Inaktivierung dieses Gens im Zusammenhang mit Krebsentstehung wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle, da seine Alterierung bisher nur selten beobachtet wurden (Schutte et al., 1996).

Fragestellung:

Die bereits geschilderten genetischen Veränderungen im Pankreaskarzinom werfen einige Fragen auf, die aus biologischer Sicht von Bedeutung sind: Welches Gen initiiert in der Zelle die Tumorbildung und welche weiteren Ereignisse sind dafür verantwortlich, daß sich eine gutartige Tumorerkrankung zu einem aggressiv wachsenden Karzinom entwickelt. Mit anderen Worten: Gibt es ein molekulargenetisch definierbares Tumorprogressionsmodell, das den bekannten histopathologischen Veränderungen des Pankreas gegenüber gestellt werden kann? Es ist noch nicht gänzlich klar, welcher Typ der exokrinen Pankreaszellen Ausgangspunkt der Entstehung des Adenokarzinoms ist. Dennoch werden derzeit duktale Epithelzellen als wahrscheinliche Vorläufer postuliert, da sich in den Pankreasgängen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Karzinomen häufig Veränderungen des Gängepithels finden (Cubilla et al. 1976; Kozuka et al. 1979; Pour et al. 1982). Ferner hat man beobachtet, daß sich diese Vorläuferläsionen im Laufe der Zeit zu einem Adenokarzinom entwickelt haben (Brat et al. 1997).

Vogelstein und Kinzler schlugen ein genetisches Progressionsmodell für Kolonkarzinom (Darmkrebs) vor, welches die einzelnen histomorphologischen Adenomstadien nach Auftreten und Genalternierungsprofil charakterisiert. Aufgrund der genetischen Kenntnisse über das Pankreaskarzinom ist eine ähnliche genetische Progression auch für diesen Tumortyp denkbar. Zellen in Pankreastumoren zeigen ein pathologisch heterogenes Muster, d.h. in der Umgebung von Karzinomen finden sich häufig duktale Veränderungen unterschiedlicher Morphologie und Ausprägung. Dies erschwert die genetische Untersuchung der Vorläuferläsionen, da sie erstens in geringer Anzahl vorkommen und zweitens aufgrund phänotypischer Heterogenität gesondert untersucht werden müssen. Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, Pankreasgängepithelzellen mit unterschiedlichen histomorphologischen Veränderungen (siehe Abb. 1.2) molekularbiologisch zu untersuchen. Da das genomische Material der

Ausgangszellen limitiert war, wurde zunächst die gesamte DNA nach sorgfältiger Mikrodisektion der Zellen aus archiviertem Gewebe (Paraffinschnitt) vermehrt. Zu diesem Zweck wurde hier die Technik ‚*Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR*‘ (DOP-PCR) weiterentwickelt und eingesetzt.

In den zu untersuchenden Läsionen wurde nach chromosomaler Deletion auf den Chromosomen 9p, 18q und 17p gesucht, da diese bekannterweise häufig in Pankreaskarzinomen deletiert sind. Durch häufiges Auftreten der Mutation in den Pankreaskarzinomen wurden die Läsionen auch auf Punktmutationen im K-ras-Gen untersucht. Ferner wurden Läsionen parallel zu molekulargenetischen Analysen hinsichtlich der Genexpression der Suppressorgene p53 und DPC4 untersucht. Dies wurde anhand immunhistochemischer Färbungen mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

Damit umfaßt diese Studie alle bekannten Regionen, die im Pankreas-Karzinom häufig verändert sind. Die Auswertungen dieser Daten sollen zeigen, ob es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem histologischen Phänotyp der Gangläsionen und dem jeweiligen genetischen Profil der Läsionen gibt.

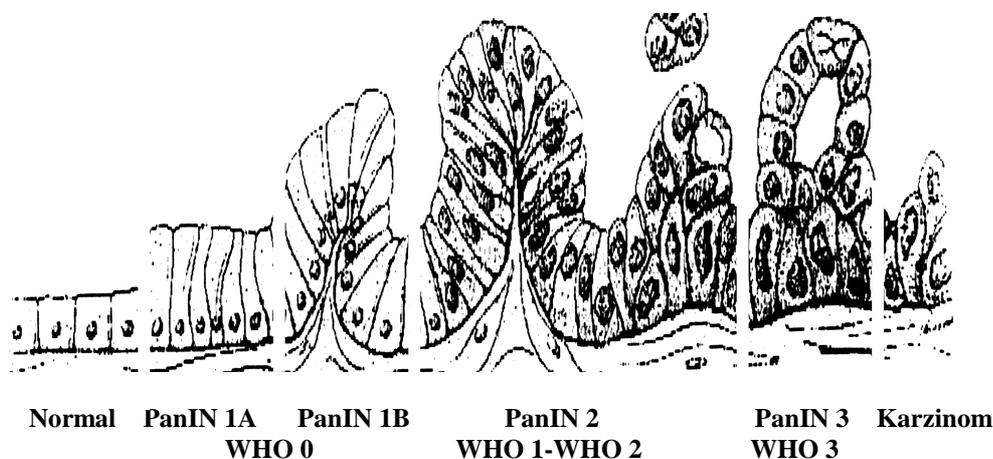


Abb.1.2: Histopathologisches Progressionsmodell des duktaalen Adenokarzinoms der Bauchspeicheldrüse. Wenn sich die normalen Epithelzellen (N) autonom vermehren, bilden sie Verwölbungen ins Lumen. Diese hyperplastischen Läsionen werden in PanIN-1A (*pancreatic intraductal Neoplasia*) mit flachen Gangepithelien ohne Zellkernatypie) und PanIN-1B (Papilläre Gangepithelien ohne Atypie) unterteilt. Dysplastische Läsionen (PanIN-2 und PanIN-3) sind immer mit einer Zellkernveränderung begleitet.

In der WHO (*world health organization*)-Klassifizierung werden die Progressionsstadien PanIN1A und PanIN 1B als ‚Hyperplasie‘ zusammengefaßt.

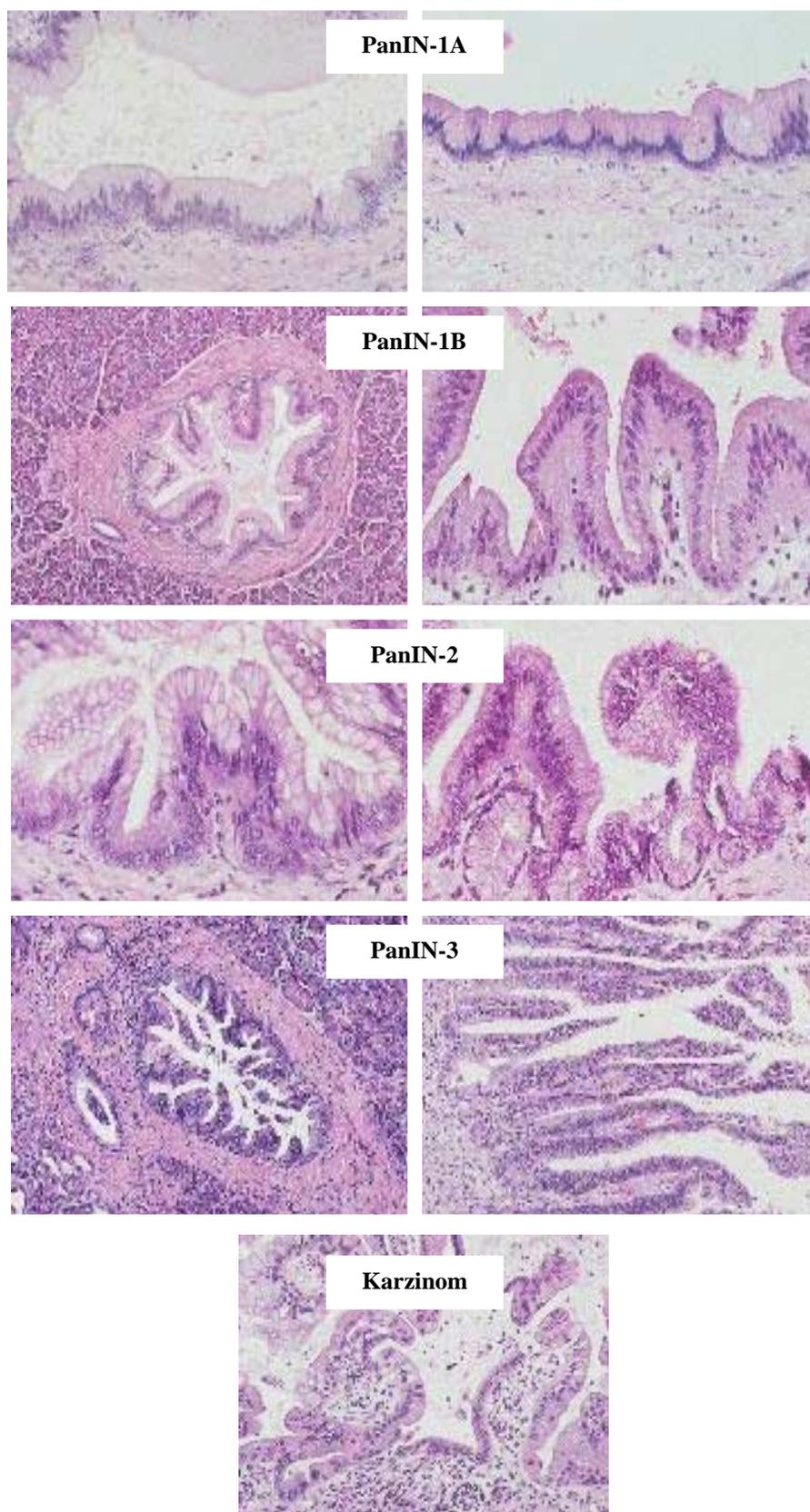


Abb. 1.3: Histopathologische Schnitte von einzelnen Stufen der intraduktalen Pankreas-Tumoren. Die Schnitte wurden HE gefärbt und bei 20x, 40x, 200x und 400x Vergrößerung photographiert.

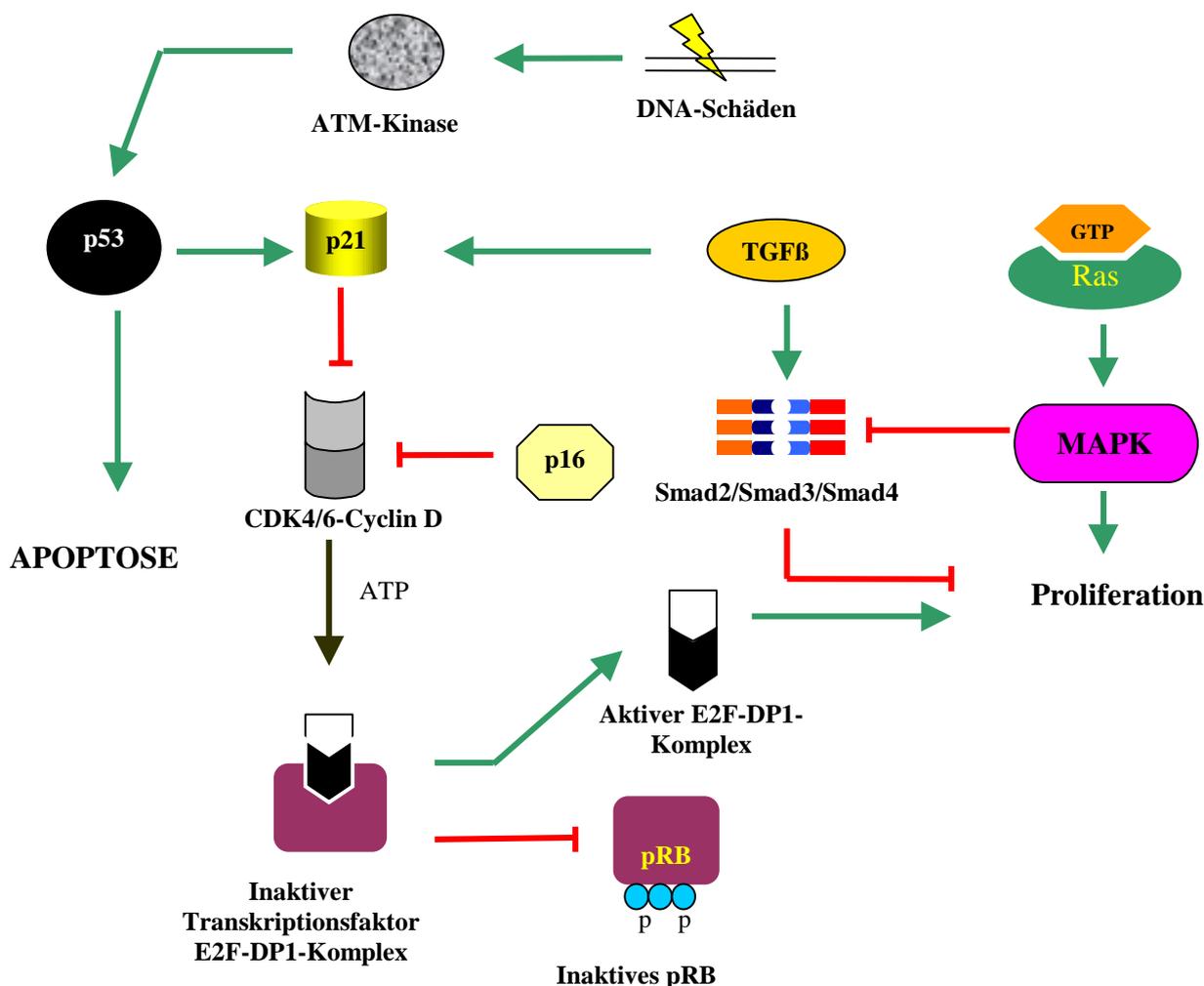


Abb. 1.4: Darstellung Zellzyklus-regulierender Gene und ihrer Signalwege, die mit unterschiedlicher Häufigkeit in den Tumoren inaktiviert sind. Einige wirken proliferationsfördernd (grüne Linie), andere dagegen haben einen inhibitorischen Effekt (rote Linie). Das Retinoblastoma-Protein (pRB) blockiert den Übergang von G1-Phase in die S-Phase (DNA-Replikation), indem es an den Transkriptionsfaktor E2F bindet. So können für die S-Phase notwendige Proteine nicht synthetisiert werden. Durch Hyperphosphorylierung, die vom CDK 4-Cyclin D-Komplex bewirkt wird, verharrt das pRB in inaktiven Zustand und setzt gleichzeitig den E2F frei.

Die Aktivität des CDK4-Cyclin D-Komplexes wird seinerseits durch p16- und p21-Proteine reguliert, wobei die Expression des p21-Protein von der Aktivität des p53-Gens abhängt. Liegen in der Zelle DNA-Schäden vor, so wird die Expression des p53 durch eine ATM-Kinase induziert. Das als Transkriptionsfaktor agierende p53-Protein bewirkt die Produktion von p21-Protein durch Aktivierung der Promotorregion. Damit wird das Fortschreiten der Mitose gebremst. Durch onkogene Aktivierung des Ras-Proteins wird andererseits das Zellwachstum über Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise *fos* und *jun* stimuliert. Ferner kann der TGFβ-Signalweg, an dem DPC4 (Smad4) beteiligt ist, durch MAPK (*Mitogene Activating Protein Kinase*) gestört werden.

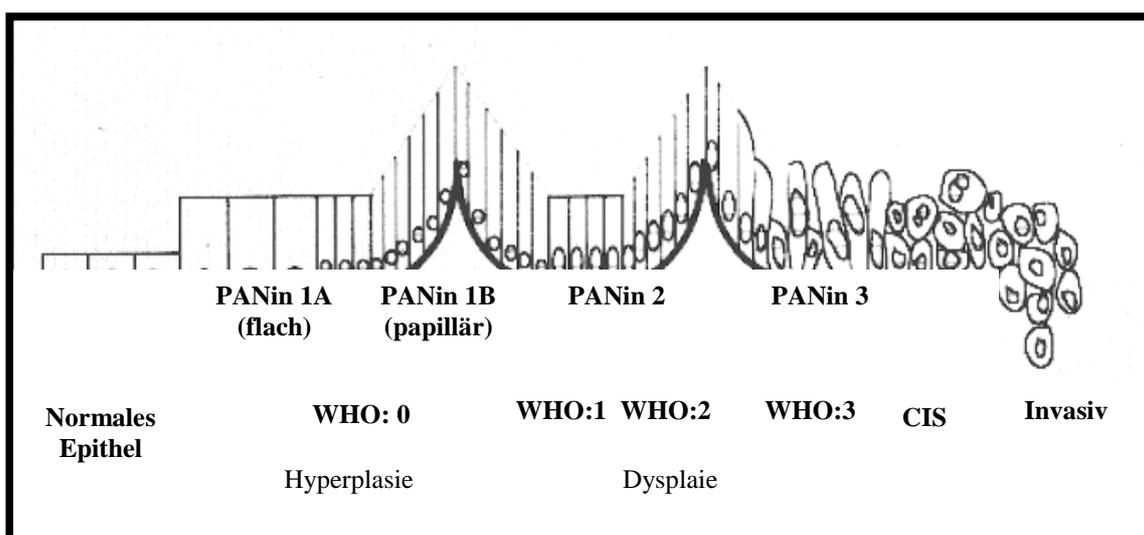
2. MATERIAL & METHODEN

2.1. Histopathologisches Material

Die vorliegende Studie untersuchte Pankreasresektate mit duktalem Adenokarzinom, die durch Wipple-Operation gewonnen wurden. Bei den Patienten handelt es sich um Frauen und Männer mit einem Durchschnittsalter von 60 Jahren. Die Operationspräparate wurden unmittelbar postoperativ in 4%iger gepufferter Formalinlösung fixiert. Aus dem Tumor wurden Gewebeproben zugeschnitten, diese in Paraffin eingebettet. Von jedem Block wurde ein 2 µm und ein 10 µm dünner Schnitt angefertigt, der 2 µm Schnitt Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt und der 10 µm Schnitt für die Mikrodissektion aserviert. Jeder Schnitt repräsentierte ca. 2 cm² Pankreasgewebe, so daß pro Organ mindestens 8 cm² Parenchym auf Gangläsionen hin untersucht wurden. Läsionen wurden pro Schnitt und Fall ausgewertet.

2.2. Tumordifferenzierung

Zur Typisierung und Stadieneinteilung existieren allgemein akzeptierte Definitionen (internationale histologische Klassifizierung von Tumoren der WHO: *World Health Organization*). Ein histologisches Progressionsmodell des duktales Pankreaskarzinoms unterteilt die neoplastischen Läsionen der Gangepithelien in solche mit hyperplastische und dysplastische Läsionen. Hyperplastische Zellen weisen keine Atypien auf, d.h. es liegt keine Zellkernvergrößerung vor. Im Gegensatz zu normalen Gangepithelien zeigt die Epithelschicht



dieser Läsionen jedoch eine Verschiebung des Zellkern-Zytoplasmas zugunsten des letzteren. Ein Fortschreiten dieses Stadiums geht mit papillärer Anordnung der Epithelschicht einher. Dysplastische Läsionen werden im Hinblick auf Zellkernanomalie in drei Stufen eingeteilt: niedrig-, mittel- und hochgradig, wobei der Übergang der letzten Stufe zum Karzinom (*carcinoma in situ*) fließend ist. Kürzlich wurde auf der Welt-Pathologen-Tagung eine neue Klassifizierung vereinbart. Dabei einigte man sich für die präneoplastischen Läsionen auf die Bezeichnung ‚*pancreatic intraductal neoplasia*‘ (*PanIN*). Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden beide Klassifizierungen berücksichtigt.

2.3. Mikrodissektion der Läsionen

Die 10 µm dicke Paraffinschichten wurden zuerst auf einem Objektträger 2x15 min. in Xylol, dann durch absteigende Alkoholreihe bis zum 70%igen Alkohol entparaffinisiert. Der Objektträger wurde mit einem Tropfen Aqua dest. benetzt. Eine Glaskapillare mit Innendurchmesser von 0.8 mm und Wanddicke von 0.1 mm wurde dann in den Kapillarenhalter eingespannt und mit dem Grobtrieb über den Objektträger gebracht (die Glaskapillare wurde zuvor mit dem Flaming/Brown Micropipette Puller aus Borosilicatglaskapillaren hergestellt). Unter Sicht durch das Mikroskop wurde die Kapillare mit dem Feintrieb (Mikromanipulator) an die zuvor markierten Stelle gebracht und das Gewebe mit Pipettenspitze herausgelöst und bei Unterdruck angesaugt. Das Gewebestück wurde schliesslich in ein 0.2 ml thin-wall-cap mit 10 µl Lysis-Buffer (10 mg/ml Proteinase K, 10 mM Tris-Cl pH 8.0 und 1% Tween 20; Fa. Sigma) transferiert, das Gefäß 1 min. bei 3000 rpm zentrifugiert und bei -20° C gelagert. Nach Mikrodissektion wurden die Schnitte gefärbt und das Dissektionsergebnis überprüft.

2.4. Whole genome amplification

Um molekularbiologische Prozesse bei der Tumorigenese verstehen zu können, ist es zwingend notwendig, die Vorläuferzellen auf genetische Veränderungen zu untersuchen, aus denen später aggressive Krebszellen entstehen. Jedoch existieren diese neoplastischen Zellen in limitierter Anzahl, so daß ihr genomisches Material nicht ausreicht, um Analysen auf der Ebene des Genoms durchzuführen. Für eine effiziente Vermehrung der gesamten Genom-DNA (Whole Genome Amplification) wurden Techniken entwickelt, deren Einsatz unter günstigen Bedingungen bestimmte Bereiche des Genoms vermehren konnten. Zwei am häufigsten verwendete Methoden, PEP-PCR (Primer Extension Preamplification) und DOP-

PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR), wurden anfangs von Zhang et al. und Telenius et al. entwickelt, um das oben beschriebene Ziel zu realisieren.

Bei der PEP-PCR wird ein 15-mer degenerierter Primer eingesetzt. Diese Methode wurde mit DOP-PCR in Hinsicht der Reproduzierbarkeit und Effizienz verglichen. In dieser vorliegenden Arbeit wurde die DOP-Methode modifiziert, verfeinert und für limitierte DNA-Menge (6-8 pg, equivalent dem genomischen Material aus einer diploiden Zelle) optimiert. Das Produkt der hier vorgestellten Version der DOP-Methode (E-DOP-PCR; enhanced-DOP) ist für die Sequenzierung beliebiger DNA-Bereiche sowie Detektion von Mutationen und Deletionen des Genoms mit einer hohen Effizienzrate einsetzbar. Darüber hinaus wurde bei der Reaktion eine thermostabile DNA-Polymerase mit *proofreading* (eine Fehlerrate von 1.3×10^{-6}) eingesetzt, um die Fehlerrate während der Amplifikation zu minimieren.

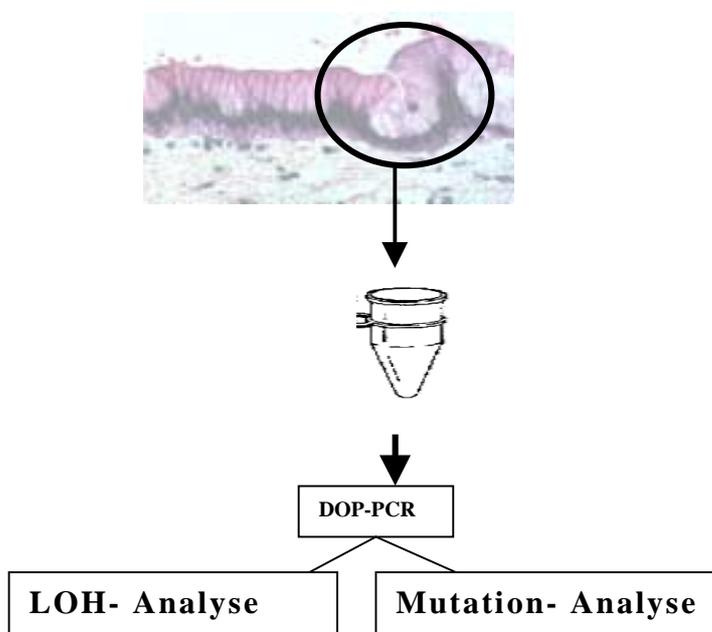


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsvorgangs der Mikrodissektion bis zur LOH-Analyse bzw. Bestimmung der Punktmutation im K-ras-Gen.

2.4.1. Prinzip von DOP-PCR

Zur DOP-PCR wird nur ein Primer eingesetzt. Das verwendete Oligonukleotid hat eine Länge von 22 Basen und enthält zwischen den beiden definierten Endsequenzen eine zufällige Hexamer-Sequenz. Zuerst werden mit der zu amplifizierenden DNA 8 PCR-Zyklen mit niedriger Stringenz durchgeführt. Durch eine langsame Erhöhung der Temperatur (Ramping) bis zur optimalen Prozeßtemperatur der Polymerase wird die Elongation der gebundenen Primer bewirkt. Dadurch werden Produkte hergestellt, die die neue DOP-Primersequenz

enthalten, so daß während der nächsten 40 Zyklen mit hoher Temperatur nur Fragmente effektiv amplifiziert werden, die komplementär zum DOP-Primer sind.

2.4.2. Durchführung der Reaktion

Als Ausgangsmaterial für die DOP-PCR wurden 40-80 Zellen, die durch Mikrodissektion aus einem Paraffinschnitt herauspräpariert wurden, verwendet. Im Falle der Single-Cell-DOP wurden kultivierte HeLa-Zellen eingesetzt. Hierbei wuchsen die Zellen im DMEM-Medium bei 5% CO₂ auf einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser subkonfluent, danach wurden sie abgelöst und in ein 15 ml Falcon-Tube (Fa. Greiner) transferiert, bei 1000 rpm kurz zentrifugiert, das Medium abgesaugt und Zellen mit PBS-Puffer resuspendiert.

Die Zellzahl wurde nun in einem Cell Counter bestimmt und auf eine Zelle pro 10 µl Lysepuffer (10mg/ml Proteinase K; 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1% Tween 20; Fa. Sigma) verdünnt. Zur Verifizierung der Zellzahl wurde eine 96-well-Titerplatte mit 10 µl Zellverdünnung/well bestückt und unter einem Lichtmikroskop geprüft.

Die Probe wurde in ein steriles 0.2 ml Tube (*thin well*) übertragen und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und bei 48°C für 15 Stunden inkubiert. Die Proteinase K wurde anschliessend 10 min. bei 95°C inaktiviert. Die DOP-PCR wurde im 50 µl Volumen (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA), 3 µM universal primer (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'), 200 µM dNTP's und 3.75 units Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene) in einem Thermocycler (MJ Research, Biozyme) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 8 Zyklen

94°C für 1 min., 30°C für 2 min. mit Ramping zu 72°C für 3 min. und 72°C für 2 min.

Schritt 2: 40 Zyklen

94°C für 1 min., 62°C für 1 min. und 72°C für 2 min. mit 5 sec./Zyklus Verlängerung. Die Reaktion wurde mit 10 min. bei 72°C beendet und anschliessend bei -20°C gelagert. Als Negativkontrolle wurde stets eine Reaktion ohne Template angefertigt.

2.5. Mikrosatelliten-PCR

Für die Detektion des LOH (*loss of heterozygosity*) auf den jeweiligen Zielchromosomen wurden folgende Marker (Primerpaare) eingesetzt: D9S319 , D9S157, D9S304, D9S171, D18S363, D18S46, D18S877, D18S535, D18S474, D17S896, D17S786, D18S1832 und TP53-PCR15. Diese Marker liegen innerhalb von 1-10 cM (centiMorgan; ein cM entspricht

einer Megabase) der jeweiligen Tumorsuppressorgene. Zur Optimierungsreaktion der DOP-PCR wurden weitere Marker auf Chromosomen 1,2 und 4 dazu verwendet: BAT 25, BAT 40 und D2S123. Diese ausgewählten Marker wurden zuvor auf ihrer Frequenz hin

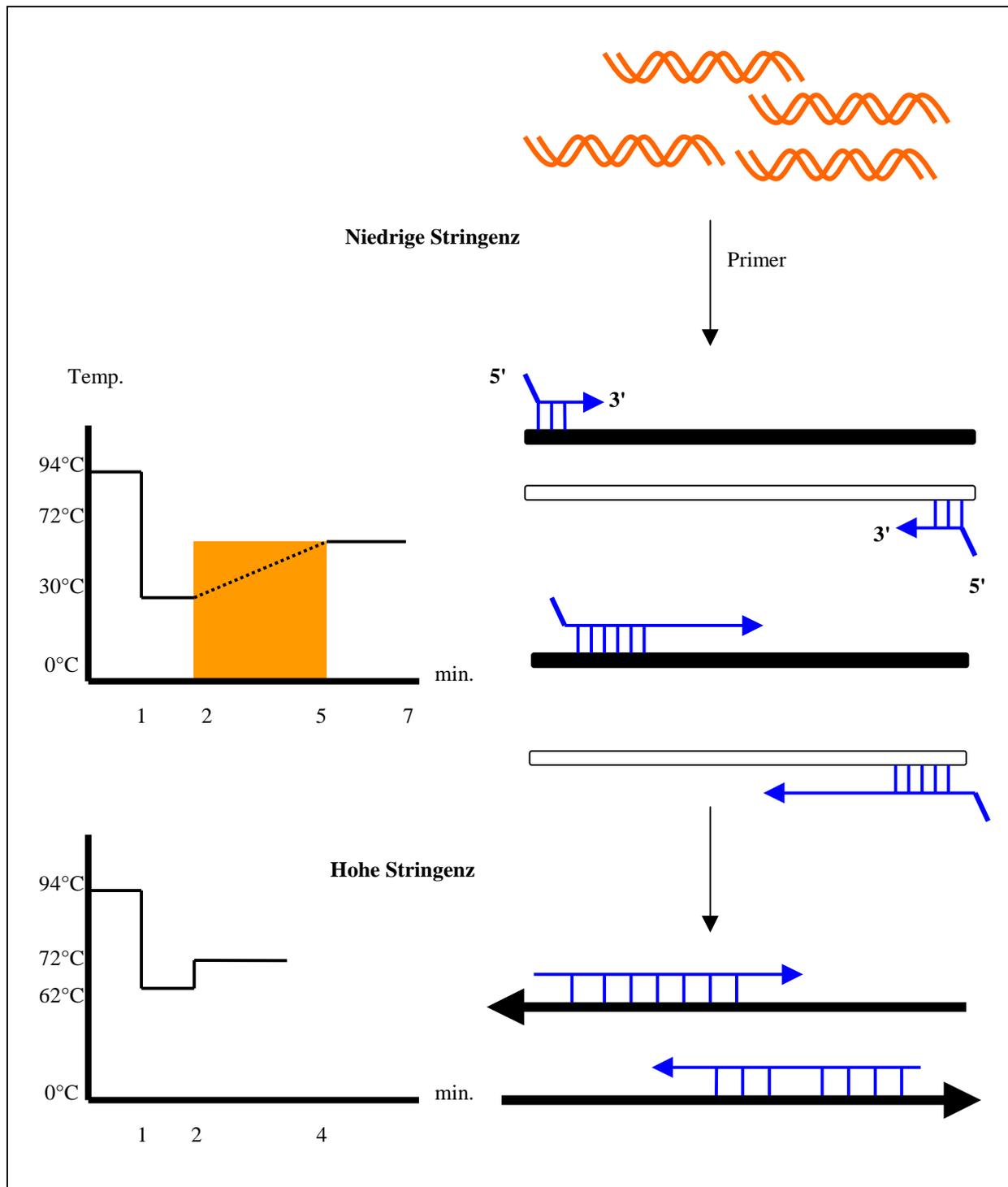


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der DOP-PCR. Sie zeigt das Temperaturprofil und die Abfolge beider Schritte während der Reaktion. Für weitere Erläuterung siehe Text.

mit unterschiedlicher Allellängen (Polymorphismus) mit Hilfe von Blut-DNA von 20 Personen getestet. Polymorphe Marker mit einer Informativitätsrate <50% wurden dabei aussortiert. Es gibt zur Zeit verschiedene Nomenklaturen der Mikrosatellitenmarker. Der Name von TP53-PCR15-Marker z.B. bezieht sich auf das Gen *TP53*. Eine andere Bezeichnung beschreibt die Quelle der Sequenz (D steht für DNA), Chromosomenzahl (die Zahl nach D) und Häufigkeit dieser bestimmten Sequenz im Genom (S steht z.B. für *Single* und deutet darauf hin, daß die Sequenz nur einmal im Genom vorkommt). Die Ziffern nach ‚S‘ sind Seriennummer der ursprünglich identifizierten Klone, die die jeweilige Repeatsequenz enthalten. Die Amplifikation der repetitiven Bereiche wurde mit Hilfe der PCR und spezifischen Primerpaare in einer 96-well Mikrotiterplatte mit einem Volumen von 15 µl durchgeführt:

100 ng je Primer (Fa. MWG), 200 µM dNTP's (Fa. Promega), 1.5 mM MgCl₂, 1.5 units *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL), optional 60 mM TMAC/ 2.5% Formamide (Fa. Sigma), 20 mM Tris-Cl pH 8.4, 50 mM KCl und 2 µl von DOP-PCR als DNA. Die Reaktion wurde dann in einem Thermocycler (Fa. Hybaid) für 40 Zyklen gestartet: 94°C: 15 sec, 55°C: 30 sec und 72°C: 30 sec.

Um festzustellen, bis zu welchem prozentualen Anteil Tumorzellen zu Normalzellen ein LOH zu detektieren ist, wurden zwei DNA-Proben ausgewählt, die auf dem Marker D18S877 jeweils nur das obere bzw. untere Allel präsentierten. Sie wurden mit den Verhältnissen 10-100% mit einer Gesamtkonzentration von 20 ng DNA/PCR gemischt und mit dem Marker amplifiziert. Die Auswertung dieses Versuches zeigte, daß bei einem 50%igen Tumoranteil eine Signalabschwächung (LOH) optisch noch bemerkbar war (Siehe Abbildung 2.3).

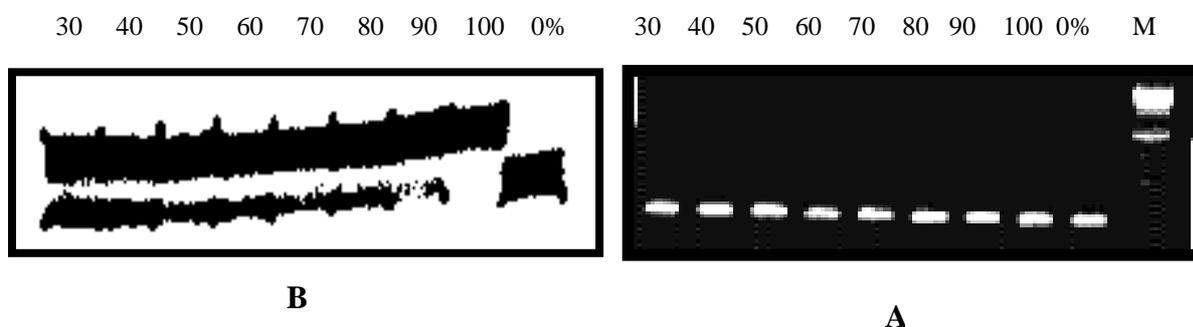


Abb.2.5: LOH-Sensitivitätstest. Genomische DNA aus zwei Tumor-Proben wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und mit einem Mikrosatellitenmarker amplifiziert. In jeder Reaktion wurden gleiche DNA-Mengen eingesetzt. Dabei war zu beachten, daß alle PCR,s exakte Produktmenge liefern. Aus diesem

Grund wurde je 3µl der PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr sichtbar gemacht und so die Qualität der Fragmente nachgeprüft (A). Danach wurden die Allele auf einem 6%igem Polyacrylamidgel mit denatureirenden Eigenschaften aufgetrennt (B).

Der Unterschied in der Signalintensität war schon bei einem 40%igen Anteil der Normal-DNA nicht oder nur schwer feststellbar. Diese Kenntniss wurde bei der Mikrodisektion der neoplastischen Läsionen aus den Paraffinschnitten berücksichtigt.

GDB Dsegment: **D17S796**

DNA type: Genomic
 ForwardPrimer: **CAATGGAACCAAATGTGGTC**
 BackwardPrimer: **AGTCCGATAATGCCAGGATG**
 STS_size: **170**

SEQUENCE:

AGCTTGCCACAATTAAGAAAACAATGGAACCAAATGTGGTCCTTGAAATCCTGGAGCAG
 TATTTTTTAACAGGTG
 CATGTATACCCCAAGTACTCAGGAGAGCATAANGGCTACTGTGAAAGNGGCACATCCTGG
 CATTATCGGACTAANGGGGCAAACCAGATTCACACATGGAATGNTCATGTCGTCAGGNCT
 AAATCTCATGCCCTTGATCCTAGTAAGTAAATGGTTGTTTTGTTANGCCACAAATTTCT
 GGGGCTGTTTGTATTTCAGCAAAGCTGTTTGTGNTCTGAAATTATTTAACTGTATGTTT
 ATTTATTGTCT

GDB Dsegment: **D17S786**

DNA type: Genomic
 ForwardPrimer: **TACAGGGATAGGTAGCCGAG**
 BackwardPrimer: **GGATTTGGGCTCTTTTGTA**
 STS_size: **149**

SEQUENCE:

ATTTGGGTGTGGANACAAAGCCTCAGCCATATCAAAGGCTCAGTTGGCTTATGATGAAGG
 NNAAAACNTCCAGGTAAATAGTGGGGCCAGAAGTAAACCTTGGGCATCTTCTTACAGGG
 ATAGGTAGCCGAGAGTGAAAGTGACATGTTTTCCAAATCATATGATTTAAAATAATTAA
 AACAAACCATAAAAAGAGAATT
 CTTTACAAAAGAGCCCAAATCCTCTTTTGGGACTCAC

GDB Dsegment: **D17S1832**

DNA type: Genomic
 ForwardPrimer: **ACGCCTTGACATAGTTGC**
 BackwardPrimer: **TGTGTGACTGTTTCAGCCTC**
 STS_size: **151**

SEQUENCE

AGTCCC CGCTCTACACACTCGGGGGTTCGGCCGCCGGCTTATCATACTGCACACAGTGAC
 AAACCCACGCCTTGACATAGTTGCCACAGAAGCAATGTCGTCTACTAACAGACACACTC
 TCAGAGGGGCATACTGGGCATTGACCCACACTCTCTCACACACACACACACACACACACA

CACACACACACACGCACCGAGGCTGAACAGTCACACANGTCTATACACAATCCCCCTCTT
TAAATAAAGGACCTAAAGNTTTTTCCAGGGAGGAGCCCCACCCTGTTNCCCCAAAGCCG

GDB Dsegment: **D18S474**

DNA type: Genomic

ForwardPrimer: **TGGGGTGTTCACCAGCATC**
BackwardPrimer: **TGGCTTTCATGTCAGAAGG**
STS_size: **125**

SEQUENCE

AGCTCAGGGTACTNAACCTTAGTACTATTGACATTTTGGGGTGAATAATTTGTTGGGGG
GTAGGAGGCTGTCCTGTGCACTATGGGGTGTTCACCAGCATCCCTGGCCTCCACCCACTA
GATGTCAGTAGTACACACACACACACACACACACACACACACACACAGTTGTGNCCAT
CACAAATGCCTTCTGACATTGAAAGCCAAACCCTCATTAGCCAGTCCAAGGCTTAAGCAA
GTTCTAGGTTGAGTACTTGAGTTAAGCATGCTCCTAAATGTTTCATATACAATGACACTT
AATCCTTAAACTCTATGAGGGAAGTAGGTACCCCTCCTACAGATGAGAG

GDB Dsegment: **D9S157**

DNA type: Genomic

ForwardPrimer: **AGCAAGGCAAGCCACATTC**
BackwardPrimer: **TGGGGATGCCAGATAACTATATC**
STS_size: **139**

SEQUENCE

CTAAATGTATGCTGTAACTCTACTTCTTACCTTAAGATCTTTAAATCAAAATGTCTG
AAGTCAGCAAGGCAAGCCACATTTTCATCTGGTAGACCCAGTTATGCATACTTACACAAAT
AGATAAATGTGCATGCACATACACACACACACACACACACACACACACACACACCCAA
GATATAGTTATCTGGGCATCCCCAGAACTAGAGATGCATTTTTAAGCTTGGCACTGCATT
TGAGAAATAGATTAATGTTCCCTACTCTACTTCCAGCCAATCAAAAGATTGTATTTAGATA
GAAGGCATGTATACAGAAGTGAGGGGGTACAGAGAAGNGTTNGGTACTTTCATGAATGCC
ACGGTGCC

GDB Dsegment: **D9S171**

DNA type: Genomic

ForwardPrimer: **AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT**
BackwardPrimer: **ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT**
STS_size: **159**

SEQUENCE

AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCTGCTGCCTCCTACAGACACACACACACACACACA
CACACACATATACATATATACATGGAAAATACTGATTGTTAATAAAGTAGCCCCAAGA
AAAATAGGATCTCAGAGACTATACCATCAGTGCTAGGGTTGNATGTTATCAGATAAATAT
CTTCCCTAATGATTTGTAGCT

D18S46

Primers:

CU18-007L **GAATAGCAGGACCTATCAAAGAGC**CU18-007R **CAGATTAAGTGAAAACAGCATATGTG**

Amplified Seq Min Length:

0.1290

Amplified Seq Max Length:

0.1530

Cytogenetic Localization:

18q21.1-18q21.1

Polymorphisms:

D18S46 Dinucleotide Repeat Dinucleotide Repeat 0.8000

D18S363

Primers:

1071 **TTGGGAACTGCTCTACATTC**1072 **GCTTCATTCTCTCACTGGAT**

Amplified Seq Min Length:

0.1770

Amplified Seq Max Length:

0.2470

Cytogenetic Localization:

18pter-18qter

Polymorphisms:

D18S363 Dinucleotide Repeat Dinucleotide Repeat 0.8700

D18S535

Primers:

seq-forward **TCATGTGACAAAAGCCACAC**seq-reverse **AGACAGAAATATAGATGAGAATGCA**

Amplified Seq Min Length:

0.1500

Cytogenetic Localization:

18pter-18qter

Polymorphisms:

D18S535 Tetranucleotide Repeat Tetranucleotide Repeat

D18S877

Primers:

forward **GATGATAGAGATGGCACATGA**reverse **TCTTCATACATGCTTTATCATGC**

Amplified Seq Min Length:

0.1370

Cytogenetic Localization:

18pter-18qter

Polymorphisms:
D18S877 Tetranucleotide Repeat Tetranucleotide Repeat

D9S304

Primers:
forward **GTGCACCTCTACACCCAGAC**
reverse **TGTGCCACACACATCTATC**

Amplified Seq Min Length:

0.1650

Cytogenetic Localization:

9p21-9p21

Polymorphisms:

D9S304 Tetranucleotide Repeat Tetranucleotide Repeat

D9S319

Primers:
forward **GCCAGTGTCTCCAGAGAAA**
reverse **TGGGATATGTCAGCCAAAAT**

Amplified Seq Min Length:

0.1730

Cytogenetic Localization:

9p21-9p21

Polymorphisms:

D9S319 Tetranucleotide Repeat Tetranucleotide Repeat

Tabelle 2.1. : Auflistung der eingesetzten Marker bei der LOH-Analyse. Diese sequenzspezifischen Marker flankieren Bereiche mit Di- und Trinukleotidrepeats (häufig beinhalten sie die CA- und CAG-Basenwiederholungen). Die Informationen zu diesen Marker wurden in der Datenbank der Johns Hopkins University, School of Medicine (*Genome data base*) unter der Web-Adresse: www.gdb.org für die Kartierung des menschlichen Genoms recherchiert.

2.6. Mutationsanalyse

Für die Bestimmung der Punktmutation im Kodon 12 des *K-ras*-Gens wurden verschiedene Techniken in Hinsicht auf ihre Sensitivität getestet, die nach folgenden beschrieben werden:

2.6.1. RFLP (Rstriktionfragment -Längenpolymorphismus)-PCR

Diese Methode wurde in drei Schritten ausgeführt. Zunächst wurde das *K-ras*-Exon 1 und ein Teil des darauf folgenden Intron mittels PCR generiert. Dabei wurde ein Upstream-Primer mit einer mismatch-Base gewählt, der während der Reaktion eine künstliche Schnittstelle (cct

ggT) für das Restriktionsenzym BstNI zwischen Kodon 11 und 12 produzierte. In darauf folgenden Restriktionsreaktion konnte das Enzym nur das Wildtyp-Fragment schneiden. Im Falle einer Punktmutation ist die Sequenz im Kodon 12 verändert und bietet damit keine Erkennungssequenz für das Enzym an. Da die Zahl der mutierten ras-Genkopien in den untersuchten Proben gering war, wurde nach dem Restriktionsverdau ein weiterer Amplifikationsschritt durchgeführt. Da die Wildtypkopien ihre Primerbindungsstelle durch den Verdau verloren hatten, konnten natürlich nur die mutierten Kopien amplifiziert und somit angereichert werden. Beide PCR's wurden mit dem Primer-Paar A (5'-act gaa tat aaa ctt gtg gta gtt gga cct-3') und B (5'-tca aag aat ggt cct gca cc-3') durchgeführt.

Für den Sentivitätstest wurde die DNA von zwei Pnkreas-Zelllinien eingesetzt (SW979 enthält die Wildtypkopie und Capan 1 die mutierte des Ras-Gens). Hierbei wurden für RFLP-PCR die DNA in den Verhältnissen 1:1, 1:10, 1:10², 1:10³ und 1:10⁴ gemischt. Die Analyse des 2.PCR-Produktes zeigte, daß die Detektion einer einzigen mutierten Kopie unter 10 000 Wildtypkopien möglich ist.

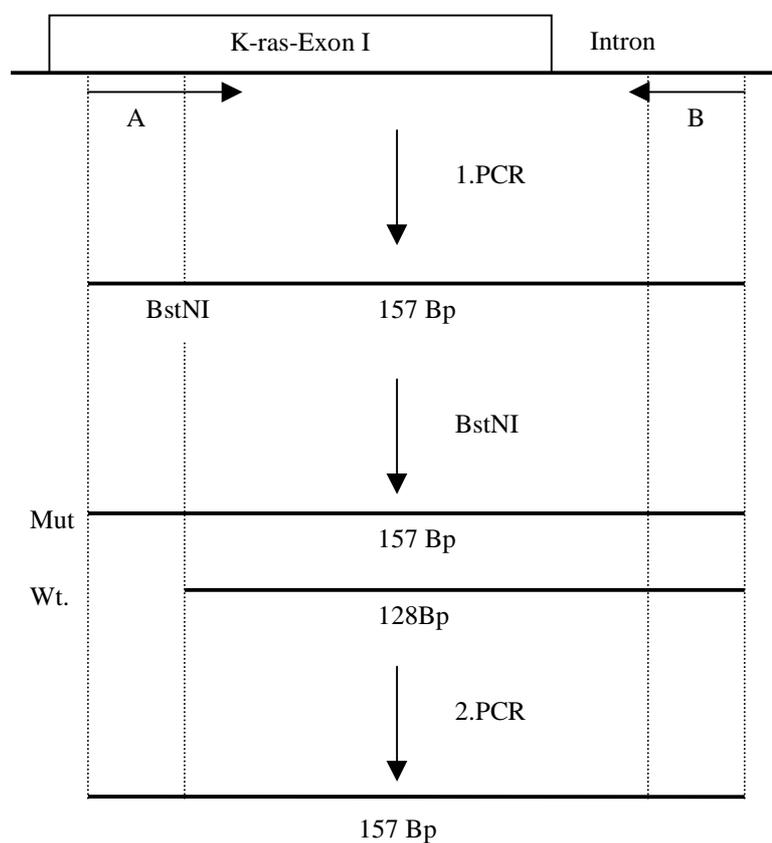


Abb.2.6: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Durchführung der RFLP-PCR. Pfeile mit der Beschriftung A & B sind die hier eingesetzten Primer für die Generierung vom Exon I-Fragment des Ras-Gens.

Die erste PCR wurde in 25µl Volumen (, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, je 250 ng Primer A&B, 20 mM Tris-Cl, 50 mM KCl und 1.5 units Taq Polymerase) in 15 Zyklen (94°C 30 sec., 60°C 1 min. und 72°C 1 min.) und ein Zyklus 72°C 5 min. durchgeführt. 15 µl des PCR-

Produktes wurden 3 h bei 60°C mit BstNI (Fa. NEB) verdaut und anschliessend über Säulen (Fa. Qiagen; PCR-Purification Kit) gereinigt und in 30 µl H₂O aufgenommen. Dieser additive Schritt war für die Entfernung der im Überschuss vorhandenen Mg-Ionen im Restriktionspuffer notwendig. 10 µl des gereinigten Restriktionsproduktes wurde dann als Template in die 2.PCR eingesetzt. Die Reaktion wurde unter gleichen Bedingungen wie bei 1.PCR durchgeführt, mit dem Unterschied, daß die Kettenreaktion in 40 Zyklen erfolgte.

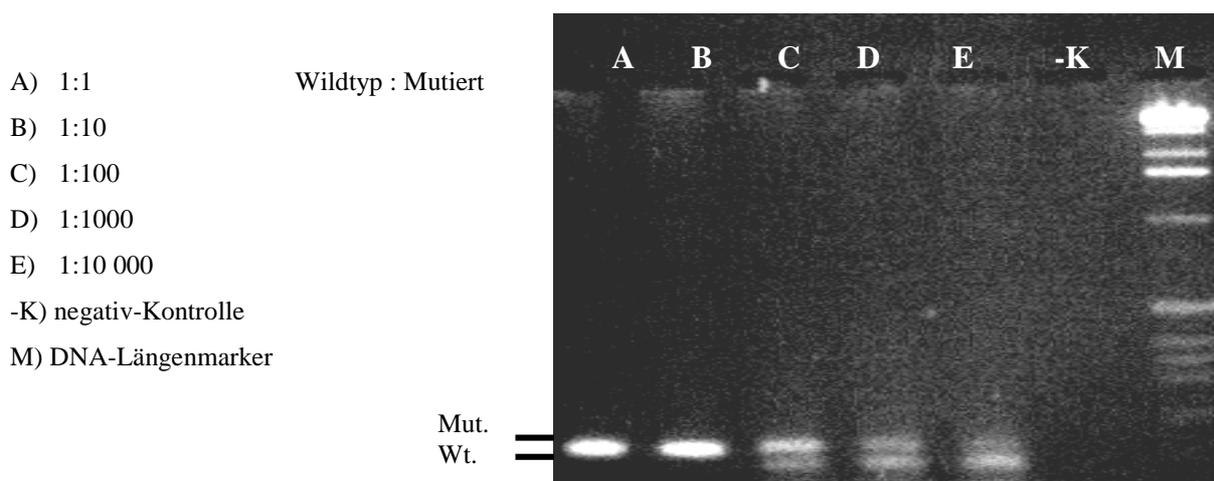


Abb. 2.7: Sensitivitätstest zur RFLP-PCR. Dabei wurden in jeder Reaktion die DNA von zwei Zelllinien, die jeweils die Wildtyp- und mutierte Version des Ras beinhalten, in verschiedenen Verhältnisse gemischt und mittels PCR amplifiziert.

2.6.2. ASO (Allelspezifisches Oligonukleotid)

Will man Allel unterscheiden, die nur in einem einzigen Nukleotid variieren, konstruiert man im allgemein allelspezifische Oligonukleotid(ASO)-Sonden, in denen der Bereich mit dem veränderten Nukleotid enthalten ist. ASO-Sonden sind in der Regel 15-20 Basen lang und werden unter Hybridisierungsbedingungen eingesetzt, bei denen ein DNA-Doppelstrang aus Sonde und Ziel-Sequenz nur dann stabil ist, wenn seine Basen vollkommen komplementär zueinander sind. Die Oligonukleotide müssen daher so konstruiert sein, daß sich das eine abweichende Nukleotid der beiden Allele möglichst in der Mitte der Sequenz befindet. Dann ist die thermodynamische Instabilität am grössten. Diese Methode wurde hier für die Detektion der Punktmutation im K-ras-Gen eingesetzt. Dabei wurde mittels PCR ein Fragment generiert, daß die Ziel-Sequenz beinhaltet. Das Produkt wurde über Dot-Blot oder

Souther-Blot mit vier verschiedenen Sonden hybridisiert. Drei Sonden waren für Bestimmung der Mutation im Kodon 12 (GAT,CGT,GTT) und eine Sonde für den Wildtyp (GGT) ausgewählt. Die PCR wurde in 25 µl Volumen durchgeführt. Dabei wurden je 100 ng Primer: K-ras-5alt (5'-gag aat tca tga ctg aat aac ttg t-3') und K-ras-SRI (5'-tcg aat tcc tct att gtt gga tca tat tcg-3'), 4 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 1x RDA-Puffer und 1.5 units Taq. Polymerase eingesetzt. Das PCR-Programm wurde folgend ausgeführt: 94°C 3 min. ein Zyklus; 94°C 30 sec, 57°C 1 min., 72°C 1 min. für 40-45 Zyklen. Anschliessend einmal bei 72°C für 5 minuten. Die Sonden (je 30 pmol) für die Hybridisierungsreaktion wurden mit p³²-γATP (Fa. Amersham) und T4-Kinase endmarkiert.

2.6.2.1. Dot-Blot

Hierbei wurden je 2 µl des PCR-Produkts auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Fa. Hybound) punktförmig aufgespottet. Die Membran wurde dann 15 min. in 0.4 M NaOH denaturiert und dann 5 min. in Tris-HCl (pH7.5) neutralisiert. Die Proben wurden danach unter UV-Licht mit dem Filter kovalent gebunden (immobilisiert) und im Hybridisierungspuffer (Blotto 10) für eine Stunde bei 50°C vorhybridisiert. Nun wurden je 3 pmol endmarkierte Sonden in 10 ml Blotto 10 verdünnt und mit der Membran für 2h hybridisiert. Nach Entfernung der Sonde wurde der Filter zuerst 5 min. mit Waschpuffer (2x SSC, 0.1% SDS) bei RT, dann 20 min. bei 60 °C und schliesslich wieder 5 min. bei RT gewaschen. Die Membran wurde in eine Folie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm (Fa. Kodak) ÜN bei -80°C exponiert. Man muss bei dieser Methode darauf achten, daß der Durchmesser der aufgespotteten Probe klein bleibt, um eine optimale Intensität der Signale und damit gute Sensitivität zu erzielen.

2.6.2.2. Southern-Blot

Hier wurden erst die PCR-Produkte in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und photodokumentiert. Das Gel wurde dann in 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH 2x 15 min. denaturiert und in 1M Tris-Cl pH 7,4 für 2x 15 min. neutralisiert, danach 30 min. in 20 x SSC equilibriert und ÜN in 20 x SSC auf eine N⁺-Membran(Amersham) transferiert.

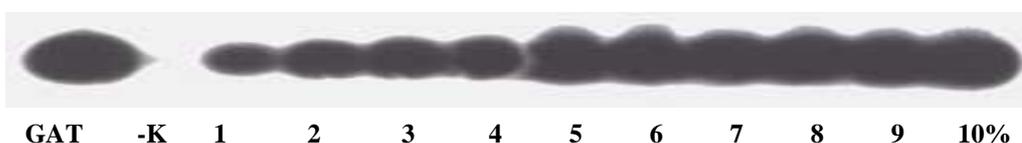


Abb. 2.8: Sensitivitätstest anhand einer Verdünnungsreihe. Hier wurden mutierte und Wildtyp-DNA in verschiedenen Verhältnisse gemischt, amplifiziert und nach dem Southern-Blot mit den radioaktiv markierten Sonden (hier eine Sonde für die Detektion von GAT-Mutation im Codon 12 des Exons 1 vom k-ras-Gens) hybridisiert (16 Stunden Expositionszeit).

Die DNA wurde am nächsten Tag unter UV-Licht für 3 min. immobilisiert. Die weiteren Schritte wurden wie unter Dot-Blot beschrieben, durchgeführt.

2.6.3. SSCP (*single strand conformational polymorphism*)

Einzelsträngige DNA neigt zur Rückfaltung und zur Ausbildung komplexer Strukturen, die durch schwache intramolekulare Wechselwirkungen, besonders durch die Wasserstoffbrücken bei der Basenpaarung, stabilisiert werden. Die elektrophoretische Mobilität solcher Strukturen in einem nichtdenaturierenden Gel hängt nicht nur von der Länge der Molekülkette ab, sondern auch von der Konformation, die wiederum durch die DNA-Sequenz bedingt ist.

Für die SSCP-Analyse denaturiert man die amplifizierten DNA-Proben und lädt sie auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel. Die Konzentration des Gels muss dabei abhängig von

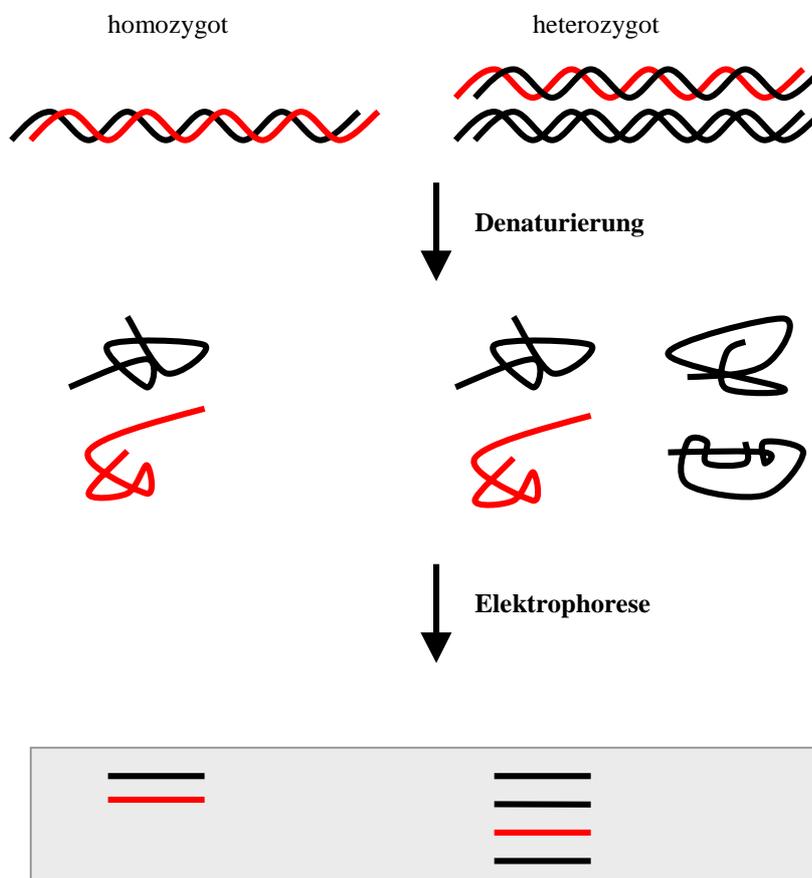


Abb. 2.9: Schematische Darstellung des Versuchsvorgangs bei der SSCP-Analyse zur Bestimmung der Punktmutationen.

der Fragmentlänge optimiert werden, um eine gute Auftrennung der Banden zu erreichen. Die Reaktionsprodukte können dann z.B. durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Um Unterschiede zum Wildtypmuster bemerken zu können, sind bei jedem Versuch Kontrollproben erforderlich.

Die SSCP-Analyse ist in der Durchführung einfach und erzielt eine relativ gute Sensitivität. Die Sensitivität geht jedoch bei Fragmenten über 200 bp deutlich zurück (aufgrund der Komplexität der langen DNA-Sequenzen und häufiger Neigung zur Bildung von Sekundärstrukturen während der Elektrophorese). Darüber hinaus kann man anhand dieser Analyse nur das Vorhandensein einer Mutation bestimmen, und nicht die Art und Position der Mutation (Sheffield et al., 1993). Das genaue Bandenmuster hängt stark von den Versuchsbedingungen wie beispielsweise der Temperatur des Gels ab. Putativ mutierte Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und nach der Reamplifizierung direkt sequenziert.

2.7. Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten

Bei der Zyklus-Sequenzierung (thermal cycle sequencing, Sears et al. 1992, Slatko 1994) wird eine relativ geringe Menge an Matrizen-DNA mit einem großen Überschuss an Primern, dNTPs und ddNTPs und einer thermostabilen DNA-Polymerase inkubiert. Durch die lineare Amplifikation der DNA in den verschiedenen Zyklen sind femto Mol-Mengen an Matrizen-DNA ausreichend für eine erfolgreiche Sequenzierung. Hierbei muss allerdings auf die Qualität (Reinheit) der DNA geachtet werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in der Automatisierbarkeit, d.h. separate Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte entfallen. Für die Sequenzreaktionen der K-ras-PCR-Produkte wurden 3 pmol vom Primer K-RAS2A (5'-att cgt cca caa aat gat-3') eingesetzt. Er wurde mit p^{32} - γ dATP am 5'-Ende mittels T4-Kinase markiert. Alternativ wurde der Primer fluoreszenz markiert (5'-Fuorophor, IRD700, Fa. MWG) und die Reaktion mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (LI-COR DNA ReadIR 4200, Fa. MWG) analysiert. Die Reaktionen wurden mit Sequenase-Kit (Fa.

Amersham) in einem 96-well-Titerplatte mit einem Volumen von 3.5 µl unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C	2 min.	
95°C	15 sec	
57°C	30°C	20-30 Zyklen (PCR-Cycler, Fa. MWG)
72°C	30°C	

Im Prinzip können alle PCR-Produkte zur Sequenzierung von DNA verwendet werden (Innis et al. 1988, Gyllensten 1989, Rao 1994). Um gute Ergebnisse zu erzielen, sollten allerdings Nukleotide und PCR-Primer vor der Sequenzierung vollständig abgetrennt oder ausreichend hoch verdünnt werden. Überschüssige dNTPs würden das ddNTPs/dNTPs-Verhältnis, das für die Sequenzreaktion optimiert sein muss, verändern und somit die Spezifität verringern. Außerdem können Primer-Reste der PCR-Reaktion mit dem Sequenzierprimer konkurrieren und so die Sensitivität herabsetzen. Daher wurden alle PCR-Produkte vor der Sequenzierung mit Exonuklease 1 (zur Degradierung von Primerresten) und SAP (shrimp alkaline phosphatase, zur Abtrennung der Phosphatgruppen von dNTP-Molekülen) 30 min. bei 37 °C inkubiert. Die Enzyme wurden anschliessend 15 min. bei 80 °C inaktiviert.

2.8. Isolierung genomischer DNA aus Paraffinschnitten

Die 10 µm dicken Paraffinschnitte aus dem Magen- oder Darmgewebe wurden zuerst zerkleinert und im Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, 10 % SDS, 40 mg/ml Proteinase K) 3-5 Tage bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung durch Phenol/Chloroform-Extraktion im Verhältnis 1:25 (Fa. Roth) von Proteinen befreit und die DNA mittels 10 M Ammoniumacetat und 100 % EtOH ÜN bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die Lösung 15 min. bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert, 2x mit 70 % EtOH gewaschen und luft getrocknet. Die DNA wurde dann in H₂O oder low-TE (10 mM Tris-HCl, EDTA) resuspendiert.

2.9. PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Bei diesem Verfahren werden negativ geladene DNA-Moleküle in einem Trägersystem (Polyacrylamidgel) durch ein elektrisches Feld bewegt und somit je nach Länge getrennt. Dabei unterscheidet man zwischen nativen und denaturierenden Gelen. In dieser Arbeit wurden denaturierende Polyacrylamidgele mit 5 M Harnstoff (Fa. Merck) für die LOH-Analyse (Fa. Roth) und Sequenz-Analyse (Long Ranger) mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer eingesetzt. Die nativen Gele wurden für die SSCP-Analyse sowie zur Auftrennung von PCR-Produkten mit geringen Längenunterschieden verwendet, die sich im Agarosegel sehr

schlecht trennen. Dabei wurden Proben mit Lade-Puffer gemischt, nach einem 3-minütigen Inkubationsschritt bei 95 °C kurz denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Sequenzierproben wurden mit in einem Ladepuffer befindlichen Fuchsinrot aufgetragen, wohingegen die Proben zur LOH-Analyse mit 99 % Formamide, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xyanolblau und 0,5 M EDTA 1:2 gemischt wurden. Die Proben für die SSCP-Analyse enthielten außerdem noch 15 mM NaOH. Die Proben wurden bei 50-55 °C und 80 Watt aufgetrennt.

2.10. Silberfärbung

Dies ist eine Alternative zur üblicherweise verwendeten radioaktiven Nachweismethode für DNA-Fragmente im Polyacrylamidgel. Damit lassen sich DNA-Mengen < 1 ng pro Bande nachweisen. Diese Technik beruht auf der Veränderung des Redoxpotentials durch die Anwesenheit von Nucleinsäuren. Dadurch wird die Reduktion von Silbernitrat zu elementarem Silber katalysiert. Die Ag⁺-Ionen scheiden sich an den Nucleinsäuren ab, wenn das Redoxpotential in diesem Bereich höher ist als in der umgebenden Lösung.

In dieser Arbeit wurden Polyacrylamidgele routinemäßig mit diesem Verfahren gefärbt. Das auf der Glasplatte befindliche Gel wurde zunächst zwischen einer für diesen Zweck entworfenen Holzplatte und einem Rahmen aus Kunststoff plaziert und befestigt. Im Rahmen befindet sich eine Öffnung zum Ablassen der Lösungen. Das Gel wurde nun mit 10 % EtOH 10 min. vorbehandelt, die Lösung entfernt. Dann wurde die im Gel befindliche DNA mit 1 % Salpetersäure (HNO₃) für eine Minute angesäuert, die restliche Lösung entfernt und mit A.dest. gewaschen. Nun wurde das Gel mit 0,2 % AgNO₃-Lösung für 20-30 min. gefärbt (diese Lösung wurde nach Gebrauch gesammelt und bis zu 4 x für weitere Färbungen verwendet). Danach wurde das Gel 2-3 x mit H₂O gewaschen und mit 0,3 % Na₂CO₃ + 0.0037 % Formaldehyd (CH₂O) solange behandelt, bis die Banden sichtbar wurden. Bei der Silberabscheidung (Bildung eines Grauschleiers) wurde die Entwicklerlösung abgegossen und durch frischen ersetzt. Die Reaktion wurde schließlich mit 10 % Essigsäure gestoppt und das Gel auf einen Gelrockner bei 80 °C unter Vakuum getrocknet.

2.11. Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen erfolgte die Antigendemaskierung mit der Dampfdruckmethode. Hierbei wurden monoklonale Antikörper gegen p53 und DPC4 (1:50, DO1, Calbiochem, Oncogene Research products, Cambridge, MA, USA) verwendet. Die Farbentwicklung wurde mittels eines APAAP-Komplexes oder mit Vectastain nach der ABC-

Methode durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit dem pathologischen Institut in Kiel durchgeführt.

2.11.1. Die APAAP-Methode (nach Cordell et al., 1984)

Dieses Färbeverfahren nutzt die Affinität von Antikörpern und enzymmarkierten Antikörpern gegenüber ihrem Antigen. Dazu benötigt man vier Komponenten:

Primärantikörper

Sekundärantikörper (Brückenantikörper)

APAAP-Komplex (Alkalische Phosphatase Anti Alkalisch Phosphatase)

Entwicklungslösung

Der APAAP-Komplex besteht aus einem Antikörper, der an seinen Fab-Armen jeweils ein Molekül alkalische Phosphatase trägt. Unter Zugabe von Entwicklungslösung katalysieren diese Enzyme eine Reaktion, aus der ein roter Farbstoff hervorgeht. Der Sekundärantikörper dient dazu, einerseits den Primärantikörper, der sich direkt an das gesuchte Antigen heftet und andererseits den APAAP-Komplex zu verbinden. So ist es obligat, daß Primärantikörper und APAAP-Komplex aus derselben Spezies stammen und der Sekundärantikörper aus einer anderen. Außerdem muss er im Überschuß vorliegen, so daß ein Arm des Fab-Teils an den Primärantikörper, der andere Teil an den APAAP-Komplex binden kann. Durch wiederholte Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex lässt sich die Färbung weiter verstärken, womit eine hohe Sensitivität erreicht werden kann.

2.11.1.1. Ausführung

Zu den im Grading bewerteten HE-Präparaten wurden von allen verfügbaren Tumorblöcken 2 µm dicke Schnitte hergestellt und diese zur besseren Haftung auf APES beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte trockneten ca. 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank (Fa. Haereus), bevor sie mit dem immunzytochemischen Marker inkubiert wurden.

Zunächst wurden die Paraffinschnitte in Xylol zweimal 15 Minuten entparaffiniert, anschließend in der absteigenden Alkoholreihe (2 x 100 % Xylol, 2 x 50 % Xylol/Ethanol, 2 x 100 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol und 2 x 70 % Ethanol) rehydriert und unter Leitungswasser gespült. Zur Antigendemaskierung wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet:

Die Präparate wurden in der Mikrowelle (Fa. Bosch) 15 min. bei 900 Watt und nochmals 15 min. bei 360 Watt in einem auf pH 6 eingestellten Zitratpuffer erhitzt und kühlten anschließend mindestens 30 min. bei Raumtemperatur ab. Alternativ wurde 1 Liter

Zitratpuffer (pH 6) im Dampfkochtopf auf der elektrischen Heizplatte erwärmt und kurz vor dem Sieden wurden die Schnitte in den Topf gestellt, der Deckel wieder verschlossen und der Topf weiter erhitzt, bis der größtmögliche Druck aufgebaut war. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Wärmezufuhr unterbrochen und nach weiteren 2 min. 30 sec. der Druck unter fließend kaltem Wasser abgelassen. Durch zulaufendes Leitungswasser wurde der Inhalt des Topfes abgekühlt. Die Präparate wurden 3 x mit Waschpuffer gespült. Nun erfolgte die Inkubation mit dem unverdünnten Primärantikörper, einem monoklonalen Mausantikörper, für 30 Minuten. Alle Inkubationen der Immunfärbung wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden in diesem, wie in allen folgenden Schritten, ca. 100 µl Lösung auf jeden Schnitt getropft. Auch die sich anschließende dreimalige Spülung mit Waschpuffer wurde nach folgenden immunhistochemischen Inkubationen jeweils wiederholt. Der Sekundärantikörper ist ein Kaninchenantikörper, der gegen die Mausimmunglobine gerichtet ist. Er wurde in einer Verdünnung von 1:20 25 min. lang bei Raumtemperatur mit den Präparaten inkubiert. Nach erneuter Spülung wurde nun der APAAP-Komplex in einer Verdünnung von 1:5 zugegeben. Die Einwirkzeit betrug 25 Minuten. Zur Entwicklung der Farbreaktion wurden die Präparate unter Zugabe der Entwicklungslösung 30 min. auf einem Schüttler belassen und dann unter Leitungswasser gespült und verblieben in Aqua bidest. Zur Gegenfärbung wurden den Präparaten 30 sec. Hämalan zugesetzt und unter Leitungswasser gespült. Die Dehydrierung erfolgte in der aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 % Ethanol und 3 x Xylol. Die Präparate wurden mit Petrex (Fa. Medite) eingedeckt.

2.11.1.2. APAAP-Reagenzien

Zitratpuffer:

2.1 g Zitronensäure- Monohydrat (Fa. Merck) in 1 l Aqua .bidest. (pH6).

Waschpuffer:

g Tris Base (Fa. Sigma), 34.25 g Tris (Fa. Sigma), 43.9 g NaCl (Fa. Merck) in 5 l Aqua bidest. PH 7.4.

Entwicklungspuffer:

8.7 g NaCl, 1.5 g Tris, 4.9 g Tris-Base in 1 l Aqua bidest., bei 4 °C lagern.

Propandiollösung:

21 g Propandiol (Fa. Merck) in 1 l Aqua bidest., bei 4 °C lagern.

Neufuchsin:

5 g Neufuchsin (Fa. Sigma) in 100 ml 2N HCl, in dunkler Flasche bei 4 °C.

Entwicklungslösung:

220 ml Entwicklungspuffer, 78 ml Propandiollösung, 125 mg Levamisol (Fa. Sigma) dazu nach einer Minute Reaktionszeit folgende Stoffe :

62.5 mg Natriumnitrit, 1512 ml aqua bidest., 625 ml Neufuchsin, nach einer Minute Reaktionszeit folgende Stoffe:

155 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat (Fa. Merck), 1875 ml DMF (Fa. Merck), pH 8.8 einstellen und filtrieren.

2.11.2. Das Vectastain ABC-System (Fa. BIOLOGO)

Um ein Antigen in der Immunhistochemie nachzuweisen, wird nach der Applikation eines biotinylierten Sekundärantikörpers ein vorgeformter Komplex aus Streptavidin und biotinyliertem Enzym (Peroxidase) eingesetzt. Die Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ist um mehrere Zehnerpotenzen höher als die zwischen Antigen und Antikörper. Dies verringert die Gefahr von Auswertungen während der verschiedenen Färbeschritte.

2.11.2.1. Ausführung

Entparaffinisierungsreihe bis zum A.d.

Vorbehandlung: a) 90 min. Dampfkochtopf.

b) oder 5-10 min. Protease- Behandlung bei 37 °C.

dann Alkoholreihe von A.d. bis zum 96 % EtOH.

1 % H₂O₂ in Methanol (2 ml Wasserstoffperoxid in 200 ml EtOH) zur Blockierung endogener Peroxidase, Alkoholreihe bis zu A.d., Waschpuffer.

Inkubation mit 4 % Milchpulver verdünntem Normalserum (15µl NS/ml) 20 min. bei RT. Dies verhindert die unspezifische Antikörperbindung an Gewebe wie z.B. Kollagenfasern. Danach wird das überschüssige Normalserum abgesaugt.

Auftropfen des Primärantikörpers (in 2 % Milchpulver); 45 min. bei RT. Mit PBS Waschen, putzen.

Auftropfen des biotinylierten Sekundärantikörpers (in 2 % Milchpulver); 30 min. bei RT. Mit PBS Waschen, putzen.

ABC-Reagenz dazu geben. 30 min. Inkubationszeit. Mit PBS Waschen.

Inkubation mit Peroxidasesubstrat/Chromogengemisch (DAB mit Nickel-Cobalt-Verstärkung 5-10 min. ohne H₂O₂ und 10 min. mit Wasserstoffperoxid. Danach mit A.d. waschen.

Kernfärbung mit Hämatoxylin.

Wässern, Entwässern, Eindecken.

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, 0.01 M Phosphat, 0.15 M NaCl, pH 7.2-7.5).

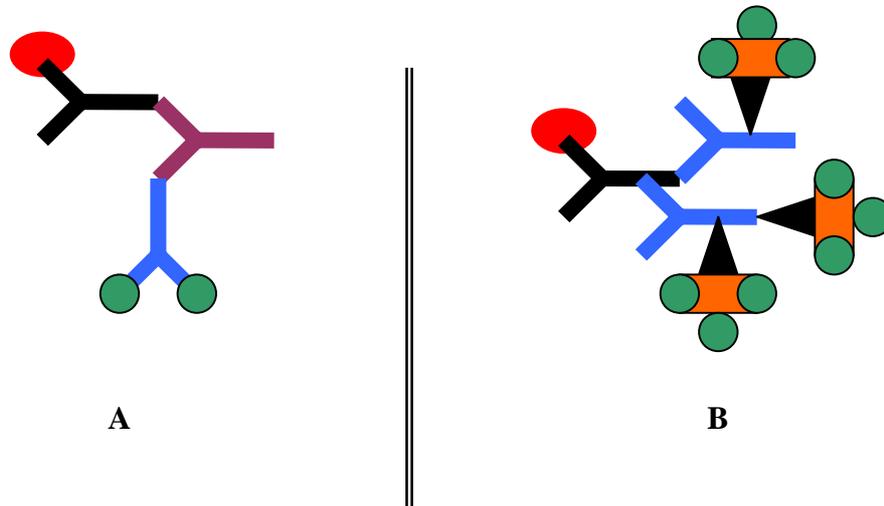
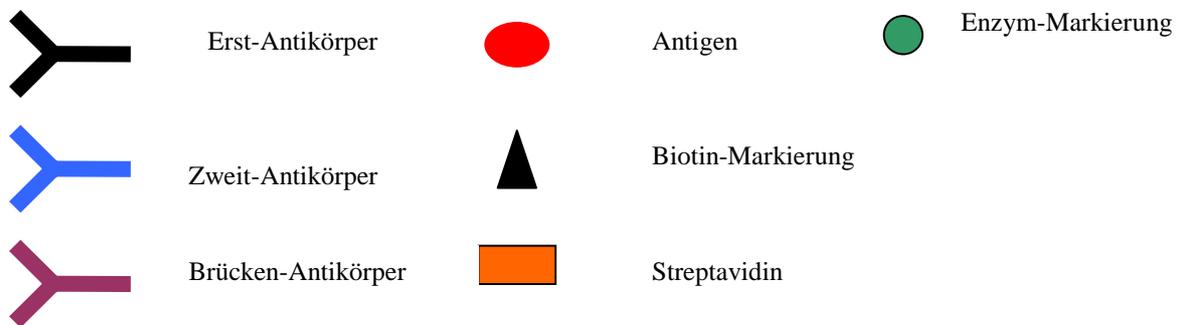


Abb. 2.10: Funktionsprinzip der immunhistochemischen Detektion mittels A) APAAP-Methode und B) Biotin-Streptavidin-Signalverstärkungssystem.



3. ERGEBNISSE

3.1. Evaluierung der DOP-PCR

Da die Anzahl der neoplastischen Zellen in den zuvor mikropräparierten Läsionen der wesentliche begrenzende Faktor für alle nachgeschalteten Analysen war, mußte eine Technik gewählt werden, mit der das genetische Material aus den wenigen Zellen (40-80 Zellen/Läsion) zuverlässig und reproduzierbar vermehrt werden kann. Für diesen Zweck wurden Methoden wie *Whole genome amplification* entwickelt, wovon es in der Zwischenzeit verschiedene Abwandlungen gibt. Bis heute haben sich vor allem zwei Methoden durchgesetzt - bekannt als PEP-PCR und DOP-PCR. Die meisten bisher publizierten Anwendungen der PEP- oder DOP-PCR haben 1 ng und mehr DNA eingesetzt. Für diese Studie stand jedoch nur wenig genomisches Material zur Verfügung (im Picogramm-Bereich). Weiterhin ist bekannt, daß die Qualität der DNA durch Formalinfixierung entscheidend beeinträchtigt wird. Hinsichtlich dieser Einschränkungen wurde die DOP-PCR im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit weiter entwickelt und insofern optimiert, daß eine reproduzierbare Amplifizierung der DNA möglich wurde. Zur Verifizierung der optimierten DOP-Methode wurde versucht, die DNA aus einer einzigen Zelle (eine diploide Zelle besitzt ca. 8 pg genomische DNA) zu amplifizieren. Zu diesem Zweck wurden zunächst kultivierte Zellen eingesetzt. Da die DNA-Isolierung zu weiterem Verlust des genomischen Materials führen kann, mußte eine Alternative gefunden werden, die gleichzeitig die Zelle lysiert, die DNA weitestgehend von Zellkernproteinen befreit und mögliche inhibitorische Faktoren eliminiert. In einer Studie wurde gezeigt, daß das Blut direkt für konventionelle PCR eingesetzt werden kann, wenn es zuvor 3-5 min. bei 600 W in einer Mikrowelle vorbehandelt wird (BioTechniques 1997). Diese Modifikation erwies sich bei der DOP-Methode als unzureichend, da sie zu weiteren Strangbrüchen in der DNA (verursacht durch die Mikrowellenenergie) führte und folglich die Effizienz der darauffolgenden PCR's begünstigte. Ebenso wurden durch das Aufkochen der Zellen (bei 95 °C) negativ beeinflusste Ergebnisse beobachtet. Durch Behandlung der Zellen vor der DOP-PCR mit einem optimierten Lysepuffer wurde eine repräsentative Vermehrung der genomischen DNA aus einer Zelle erzielt. Als optimaler Parameter für die Zelllyse erwies sich eine Proteinase K-Behandlung bei 48 °C, die deutlich effizienter als die sonst übliche Reaktionstemperatur von 37 °C war. Ferner wurde durch Einsatz von Tween 20 als Detergenz einerseits der Lysevorgang verbessert und andererseits zur Stabilisierung der Polymerase-Funktion

beigetragen¹. Ein weiterer wichtiger Punkt bestand in der Wahl einer thermostabilen DNA-Polymerase, die drei Kriterien zu erfüllen hatte. Erstens sollte sie eine niedrige Fehlerrate besitzen. Dies war für die korrekte Ausführung bei der Mutationsanalyse entscheidend. Hierbei kamen nur DNA-Polymerasen mit einer Leserkorrektur (*proof reading*) in Frage. Zweitens sollte sie durch eine hohe Umsatzaktivität möglichst viele Produkte generieren. Drittens sollte sie bei einer limitierten DNA-Konzentration effizient arbeiten. Nachdem eine Reihe von Enzymen getestet wurde (*AmpliTaq*, Fa. Perkin Elmer; *ProofSprinter*, Fa. AGS; *Taq Polamerase*, Fa. Life Technologies; *Taq Polymerase*, Fa. Bohringer Mannheim; *pfu* und *pfu Turbo Polymerase*, Fa. Stratagene), konnte festgestellt werden, daß die pfu-Turbo-Polymerase alle unsere Anforderungen erfüllen kann. Die hohe Umsatz- und die geringe Fehlerrate dieses Enzyms wurden in einer anderen Arbeit unter Anwendung konventioneller PCR bestätigt (Cline et al., 1996). Die Standard-*Taq*-Polymerase erwies sich durch die Generierung von häufigen Artefakten in Form von allelischem Imbalance bei der Mikrosatellitenanalyse als unzureichend. Dieses Phänomen wurde bereits für unbehandelte DNA berichtet, wenn die Konzentration der eingesetzten DNA-Menge limitiert war (Foucault et al., 1996). Weitere Parameter, wie z.B. die Konzentration von dNTP's und MgCl₂ können u.a. zu einer niedrigen Fehlerrate in der DOP-PCR beitragen (Stratagene; *PCR-application*). Ferner kann ein optimaler pH-Wert eine genaue Amplifikation maximieren. Daher wurde die DOP-Reaktion durch Feineinstellung der Parameterkonzentrationen (siehe Methoden) in Kombination mit pfu-Turbo verbessert. Die technischen Daten zur Optimierung der DOP-Methode wurden anhand der *single cell-DOP-PCR* kontrolliert und verifiziert. Hierbei wurde eine einzelne kultivierte Zelle der Hela-Zelllinie im Lysepuffer ÜN behandelt. Nach der DOP-Prozedur wurde das Produkt für verschiedene Reaktionen eingesetzt. Wichtig war vor allem, ob dieses Produkt für den Einsatz in der LOH-Analyse geeignet ist. So wurden jeweils 2 µl der DOP-PCR mit unterschiedlichen Markern in eine PCR eingesetzt, um damit diverse chromosomale Abschnitte zu amplifizieren. Wesentlich war eine gleichmäßige Amplifikation beider Allele auf den jeweiligen Chromosomenarmen. Wie in der Abbildung 3.1. ersichtlich ist, gelang es, beide Allel-Längen repräsentativ und reproduzierbar in unabhängigen Reaktionen zu amplifizieren. Zur Kontrolle wurden jeweils 10 ng unbehandelte gDNA mit den gleichen Markern generiert. Da sich die Signale vor und nach der DOP-PCR in ihrer

¹ Eine unspezifische Proteinverdau wird normalerweise mit Proteinase K in Kombination mit SDS als Detergenz durchgeführt. Der Einsatz von SDS wurde hier vermieden, da es zur Degradierung der Polymerase führen kann.

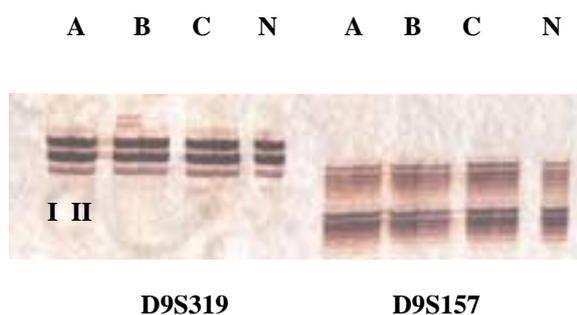


Abb. 3.1: Amplifizierung der Mikrosatelliten-Marker auf dem Chromosomenarm 9p nach *single cell*-DOP-PCR. Hierbei wurden drei unabhängige DOP-PCR (A,B,C) unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Danach wurden je 2 µl des DOP-Produktes als Template für Mikrosatelliten-PCR eingesetzt. Zur Verifizierung wurden die Reaktionen wiederholt (I & II). Als Referenz wurde jeweils die gDNA aus der gleichen Zelllinie mitamplifiziert (N). Die gleiche Signalintensität beider Allele ist ein Hinweis auf die gute repräsentative Vermehrung der gDNA bei der DOP-Reaktion.

Intensität gleichen, kann man davon ausgehen, daß 8 pg eingesetzter DNA (die Menge des genomischen Materials einer Zelle) auf ca. 250 ng vermehrt wurden². Ferner wurden ca. 100 pg gDNA in einer DOP-PCR eingesetzt (siehe Abb. 3.2). Diese DNA stammte aus archiviertem Tumorgewebe mit bekannten LOH's auf Chromosomenarmen 9p und 18q. Dieses Experiment sollte demonstrieren, ob die chromosomale Deletion nach der Vermehrung des Genoms erkennbar ist oder, bedingt durch diese Technik, falsch negative Ergebnisse zu erwarten sind. Die falsch negativen Ergebnisse können durch Insertion einiger weniger Nukleotide in dem verbliebenen Allel bedingt sein, so daß der Eindruck entsteht, beide Kopien wären vorhanden! Die Abbildung 3.2 zeigt, daß die Methode auch in diesem Punkt zuverlässig arbeitet.

Ferner wurde dasselbe Material für die Generierung der PCR's für die Mutationsanalyse verwendet. Hierbei wurde das Exon I des K-ras-Gens amplifiziert und die mutierten Kopien durch die RFLP-PCR (siehe Methode) angereichert. Die Abbildung 3.4 veranschaulicht, daß es durch *in vitro* Amplifikation der gDNA zu keiner Verschiebung zugunsten einer der beiden vorhandenen Sequenzen kommt. Die PCR-Fragmente wurden anschließend auf die Fehlerrate durch direkte Sequenzierung überprüft.

² 4 % der DOP-PCR(2 von 50µl Gesamtvolumen) entspricht (nach der Signalintensität der Referenz-DNA zu beurteilen) 10 ng.

Die Daten zeigten eine exakte Sequenzwiedergabe verglichen mit der Referenz-DNA ohne DOP-Behandlung.

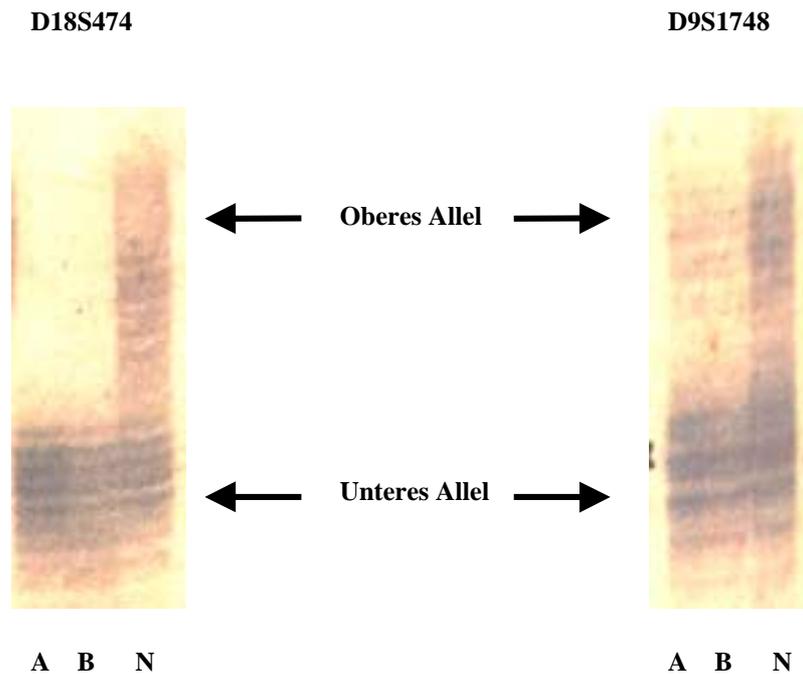


Abb. 3.2: Darstellung der LOH-Analyse nach der DOP-Reaktion. Die Tumor-Proben wurden jeweils vor (A) und nach (B) DOP-PCR mit zwei Markern auf Chromosomen 9 und 18 amplifiziert. Als Referenz wurde jeweils die gDNA aus dem Darmgewebe desselben Patienten mit den Markern amplifiziert. Mikrosatelliten-Marker mit zwei Basen-Wiederholungen (die sogenannten Dinucleotidrepeats) führen bei der PCR-Amplifizierung leicht zur Bildung einer Schleife (*loop*), so daß ein Allel im Gel eine Reihe sogenannter ‚Stotterbanden‘ zeigt, die für solche Marker charakteristisch sind.

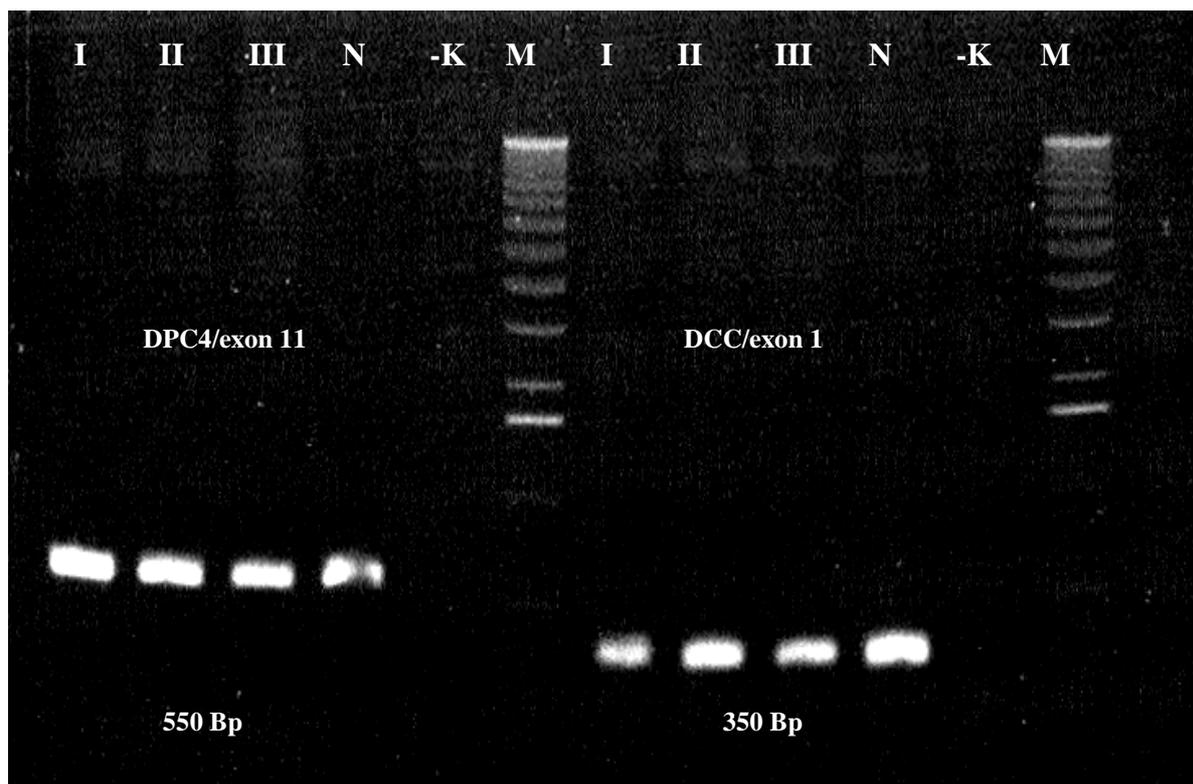
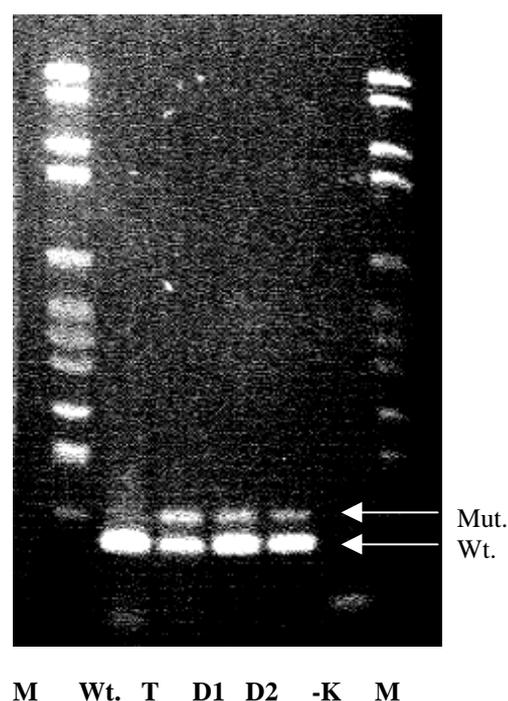


Abb. 3.3: Generierung der Genfragmente (DPC4 und DCC auf dem Chromosomenarm 18q) nach der *single cell-DOP-PCR*. Hier wurden auch aus drei parallelen DOP-Reaktionen (I,II,III) PCR-Produkte amplifiziert und die Produkte anschließend sequenziert. N: positiv-Kontrolle, -K: negativ-Kontrolle.

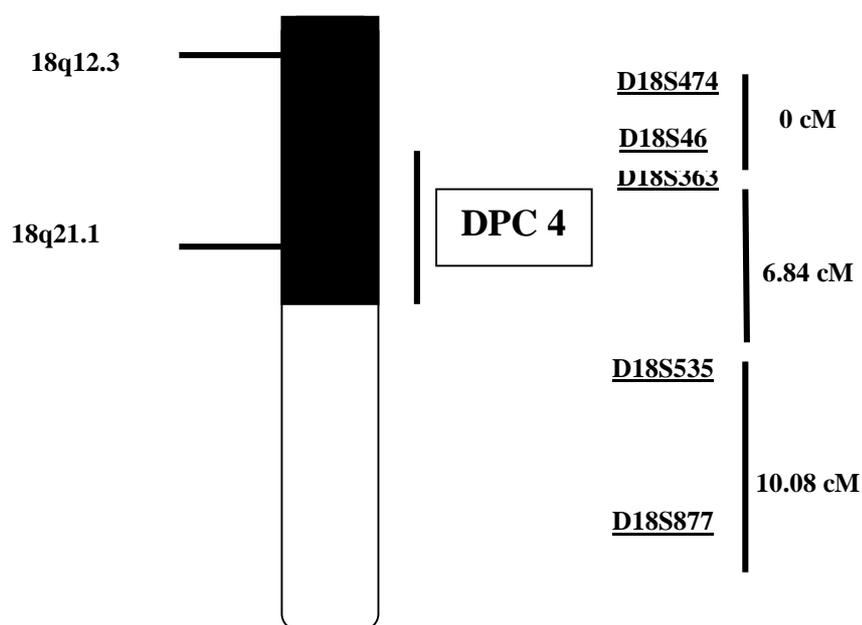
Abb. 3.4: Verifizierung der DOP-Reaktion anhand der RFLP-PCR vom K-ras/Exon I. gDNA aus 100 Zellen wurden nach der Mikrodissektion aus dem Paraffin-Schnitt vermehrt und je 2 μ l als Template (D1: DOP 1; D2: DOP2) für die Mutationsanalyse eingesetzt. Als Vergleich wurde die Tumor-DNA ohne DOP verwendet (T). Weiter wurde die normale DNA des Patienten zur Darstellung der Wildtyp-Variante mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert (Wt.). -K: negativ-Kontrolle, M: DNA-Längenmarker.



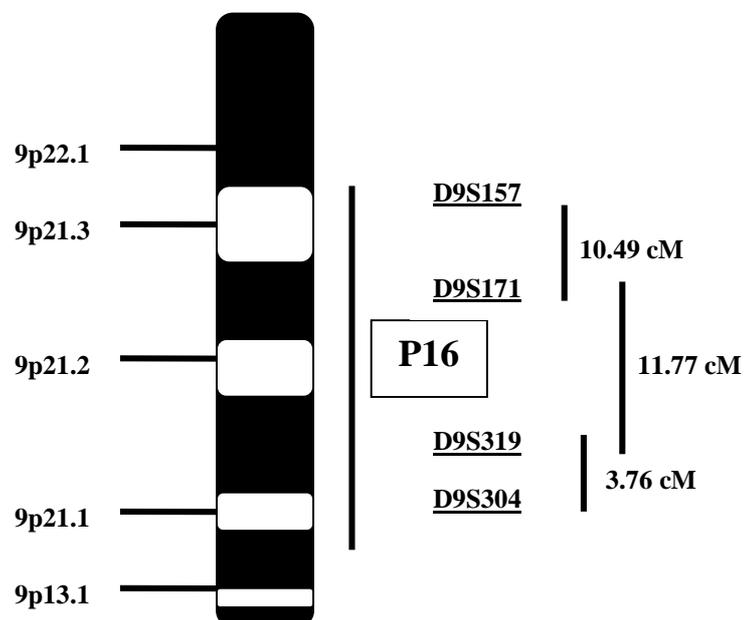
M Wt. T D1 D2 -K M

3.2. Chromosomale Deletionen in den Gangepithelien

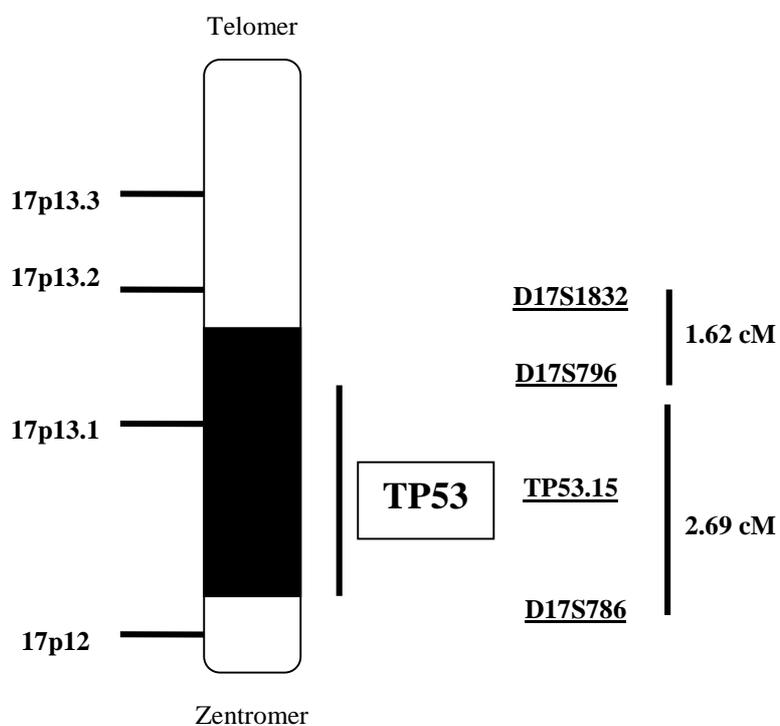
Der Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) ist ein deutlicher Hinweis auf die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Durch systematisches, paarweises Durchmusterung von Normal- und Tumorproben auf Marker, die die jeweiligen Zielgenen flankieren, wurde in dieser Arbeit die Deletionsfrequenz für die Loci 9p21, 17p13 und 18q21 bestimmt. Dabei wurden Mikrosatelliten-Marker eingesetzt, die statistisch bei den Menschen einen hohen Polymorphismus besitzen und sich relativ nahe am zu untersuchenden Gen befinden. Die in dieser Arbeit eingesetzten Marker besaßen im Durchschnitt eine 50%ige Informativität. Mit einer Ausnahme vom Marker TP53-PCR15, der intragenisch lokalisiert ist, befinden sich alle andere Marker innerhalb der nicht codierenden Introns. In der Abbildung 3.5 ist die Position der Marker auf Chromosomen 9,17 und 18 schematisch dargestellt.



A) Chromosomarm 18q



B) Chromosomarm 9p



C) Chromosomarm 17p

Abb. 3.5: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten Mikrosatelliten-Marker. Auf dem jeweiligen Chromosomenarm sind die Positionen der Marker sowie deren Abstand zueinander in Centi-Morgan (cM) angegeben, die der genetischen Kartierung entspricht. Rekombinationshäufigkeiten definieren den genetischen Abstand, der nicht dasselbe bedeutet wie der physikalische Abstand. Daher gibt eine genetische Kartierung die relative Distanz zweier Loci voneinander wieder. Auf der linken Seite des jeweiligen Chromosoms sind die Bandenmuster nach cytogenetischer (auch physikalische genannt) Kartierung angegeben. Die Marker wurden möglichst nahe an den Ziel-Genen ausgesucht. Die Tumorsuppressorgene sind entsprechend ihrer Lokalisation im schwarzen Kasten dargestellt. Das p16-Gen liegt auf dem kurzen Chromosomenarm 9p auf der Bande 21.1. Diese chromosomale Bande besteht aus drei Subbanden, die als 9p21.1, 9p21.2 und 9p21.3 bezeichnet werden. Das DPC4-Gen liegt auf der Bande 18q21.1 und das p53 auf 17p13.1.

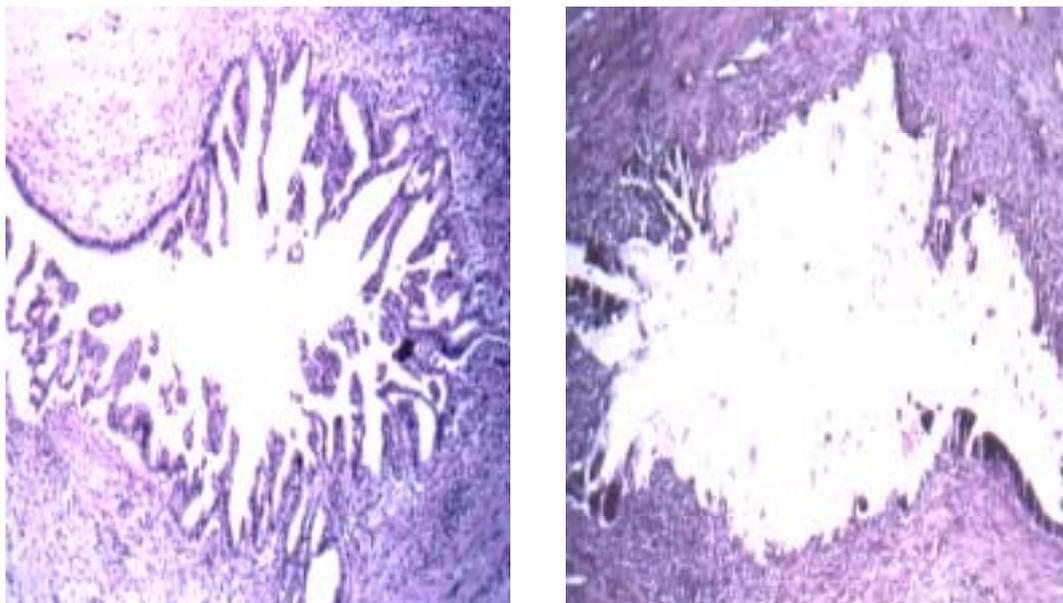


Abb. 3.6: Ein Beispiel zur Mikrodissektion der Läsionen. Für jeden Schnitt wurde ein Duplikat hergestellt und dieses mit HE (Hematoxylin-Eosin) gefärbt. Aus dem ungefärbten Schnitt wurde das zu untersuchende Zellareal herauspräpariert. Der Paraffinschnitt wurde anschließend gefärbt und unter dem Mikroskop mit dem Duplikatschnitt verglichen. Auf diese Weise wurde die histopathologische Klassifizierung der Läsionen verifiziert und zugleich der Kontaminationsgrad von normalen Stromazellen quantitativ bestimmt. Das linke Bild veranschaulicht einen Schnitt vor der Mikrodissektion. Das rechte Bild zeigt den Schnitt nach der Präparation.

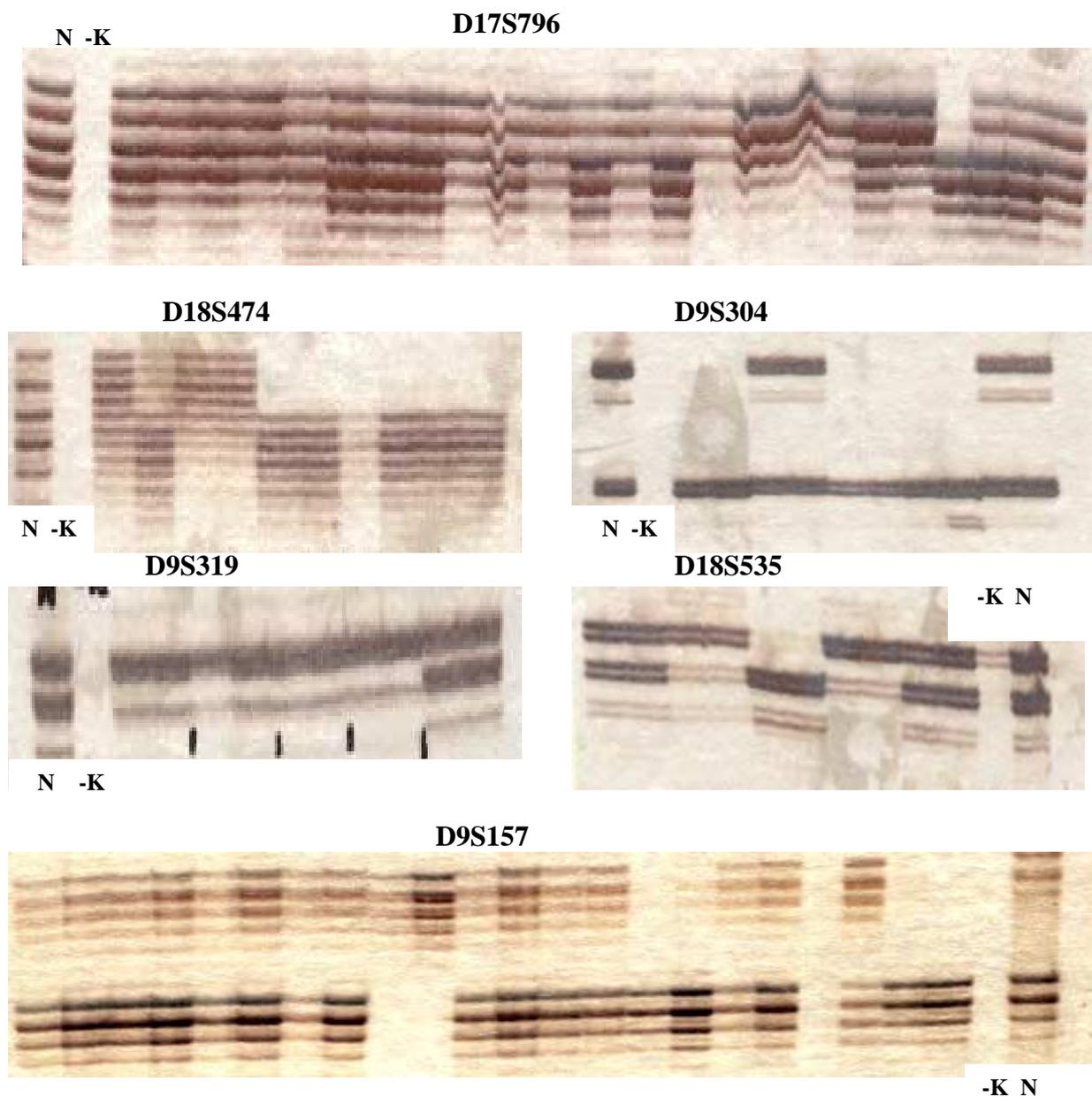


Abb. 3.7: Exemplarische Darstellung einiger PAA-Gele. Im Vergleich zu den Normalproben (N) zeigen einige Läsionen nur eine Bande. Dies bedeutet die Deletion eines Allels im Bereich des jeweiligen Mikrosatelliten-Markers (LOH). Bei wenigen Proben sind Restsignale in dem deletierten Allel sichtbar, was ein Hinweis auf Kontamination der untersuchten neoplastischen Läsionen mit Normal-DNA ist. Bei den gezeigten Beispielen handelt es sich um zwei PCR's einer DOP-Reaktion. Als Negativkontrolle (-K) wurde stets eine Reaktion mit dem entsprechenden Marker ohne Template durchgeführt.

NR.	HIS TO.	304	319	171	157	474	46	363	535	877	786	TP53	796	1832
		CEN.		TEL.		CEN.		TEL.		CEN.		TEL.		
E15 X4	2	H/H	H/H	U/U	NI	NI	NI	-/-	H/H	NI	NI	H/H	O/O	NI
	2	-	O	H	NI	NI	NI	-/-	H	NI	NI	H	O	NI
E16 X6	2	H/H	H/H	-/-	NI	NI	NI	-/-	H/H	NI	NI	H/H	H/H	NI
	2	-	O	-	NI	NI	NI	-	U	NI	NI	H	-	NI
FALL 1														
X10	1B	-	NI	H	H	O	NI	NI	U	U	NI	O	H	NI
E19	1B	-/-	NI	ND	-/-	ND	NI	NI	O/O	U/U	NI	O/-	-/-	NI
X17 E18	2	-	NI	-	O?	-	NI	NI	O	O	NI	O	H	NI
	2	-	NI	ND	U/U	ND	NI	NI	O/O	O/O	NI	O/O	-/-	NI
FALL 2														
X28	3	H	U	NI	NI	-	NI	NI	-	NI	NI	-	-	NI
E25	3	O/O	U/U	NI	NI	H/H	NI	NI	H/H	NI	NI	O/O	U/U	NI
FALL 3														
X61 E27	2	-	H	NI	NI	H	NI	NI	H	NI	NI	-	NI	NI
	2	H/H	H/H	NI	NI	U/U	NI	NI	-/-	NI	NI	O/O	NI	NI
FALL 4														
X89 E30	1B	H	H	NI	H	H	NI	H	H	NI	NI	-	-	NI
	1B	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	NI	NI	H/H	H/H	NI
X85 E29	CA.	U/U	O/O	NI	O	-	NI	-	U/U	NI	NI	-	U	NI
	CA.	-	O/O	NI	O/O	-/-	NI	-/-	-	NI	NI	U/U	U/U	NI
X79 E28	1B	H	H	NI	H	H	NI	O	O	NI	NI	-	H	NI
	1B	-	H/H	NI	H/H	H/H	NI	H/H	-	NI	NI	H/H	U/U	NI
FALL 5														
X46	1A	H	H	NI	H	NI	NI	O	O?	NI	U	NI	NI	U
E32	1A	ND	O/H	NI	H/H	NI	NI	-	O/H	NI	H/-	NI	NI	H
FALL 6														
A11	2	NI	H/H	ND	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	H/H	NI	ND	NI	HH
A12	2	NI	H/H	ND	H/H	H/H	NI	H/H	HH	H/H	NI	ND	NI	HH
A13	2	NI	H/H	ND	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	H/H	NI	ND	NI	HH
A14	2	NI	H/H	ND	H/H	H/H	NI	H/H	HH	H/H	NI	ND	NI	HH
E5	2	NI	H/H	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	NI	H/H
E6	2	NI	H/H	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	NI	H/H
A25	1B	NI	H	ND	O/O	H/H	NI	H/H	H/H	H/H	NI	ND	NI	H
E54	1B	NI	H/H	ND	H/H	HH	NI	HH	H/H	H/H	NI	ND	NI	H/H
E7	1B	NI	H/H	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	NI	H/H

K	1B	NI	H/H	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	NI	O/O
E9	2	NI	H/H	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	NI	H/H
K	2	NI	H/H	H/H	H/H	H/H	NI	H/O	H/H	H/H	NI	H/H	NI	H/H
E10	1B	NI	H/H	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	NI	H/H
K	1B	NI	H/H	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	H/H	H/H	NI	H/H	NI	H/H
FALL 7														
A29	1B	NI	U/U	NI	O/H	U/O	NI	NI	?	NI	NI	NI	U	NI
E52	1B	NI	O/O	NI	H/H	H/H	NI	NI	H/H	NI	NI	NI	U/U	NI
A30	2	NI	H/H	NI	U/U	-	NI	NI	H	NI	NI	NI	U	NI
E51	2	NI	H/H	NI	U/U	U/U?	NI	NI	-/-	NI	NI	NI	U/U	NI
A42	CA.	NI	H/H	NI	H	U/U	NI	NI	O	NI	NI	NI	H	NI
E53	CA.	NI	U/U	NI	U/U	U/U	NI	NI	O/O	NI	NI	NI	U/U?	NI
FALL 8														
C31	1A	HH	NI	NI	UU	NI	HH	HU	NI	HH	NI	HH	NI	HO
K	1A	HH	NI	NI	-O	NI	H-	--	NI	H-	NI	HH	NI	--
C33	1A	HH	NI	NI	HH	NI	HH	HH	NI	HH	NI	HH	NI	HH
K	1A	HH	NI	NI	HH	NI	HH	--	NI	HO	NI	H-	NI	H-
C34	1B	HH	NI	NI	HH	NI	HH	HH	NI	HH	NI	HH	NI	HH
K	1B	H-	NI	NI	HH	NI	HH	H-	NI	HH	NI	H-	NI	H-
C35	1A	--	NI	NI	HH	NI	HH	HH	NI	HH	NI	HH	NI	HH
K	1A	--	NI	NI	HH	NI	HH	H-	NI	HH	NI	H-	NI	H-
C36	1B	HO	NI	NI	OU	NI	HO	HO	NI	HH	NI	HH	NI	OO
K	1B	HH	NI	NI	OH	NI	HH	HH	NI	HH	NI	H-	NI	O-
C41	1B	HH	NI	NI	HH	NI	HH	HH	NI	HH	NI	HH	NI	HH
K	1B	HH	NI	NI	HH	NI	HH	HH	NI	HH	NI	--	NI	HH
FALL 9														
C47	1B	HH	NI	NI	HH	NI	UU	NI	HH	NI	NI	--	NI	HH
K	1B	HH	NI	NI	H-	NI	SS	NI	HH	NI	NI	--	NI	H-
C51	1A	OO	NI	NI	HO	NI	HH	NI	UU	NI	NI	HH	NI	HH
K	1A	--	NI	NI	U-	NI	UU	NI	--	NI	NI	HH	NI	O-
C52	1B	HH	NI	NI	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	--
K	1B	HH	NI	NI	HH	NI	HH	NI	HO	NI	NI	HH	NI	--
FALL 10														
D50	2	NI	O/O	H/H	H/O	NI	H/H	H/H	NI	-	NI	-/-	NI	H/H
E56	2	NI	O/O	H/H	O/O	NI	-/-	U/U	NI	O/O	NI	O/O	NI	U/U

FALL 11														
E3	CA	NI	HH	UU	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	OO	NI	HH
E4	CA	NI	HH	UU	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	OO	NI	HH
FALL 12														
E35	1B	HH	HH	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	HH	NI
K	1B	HH	HH	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	HH	NI
E36	1B	HH	HH	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	HH	NI
K	1B	HH	HH	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	HH	NI
E38	CA	OO	HO	UU	NI	HH	NI	-O	NI	NI	OO	NI	UU	NI
K	CA	OO	OO	UU	NI	HH	NI	OO	NI	NI	-O	NI	-U	NI
FALL 13														
E63	1A	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	HH	HH	HH	HH
K	1A	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	HH	HH	HH	HH
E64	1B	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	HH	HH	HH	HH
K	1B	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	HH	NI	HH	HH	HH	HH
E65	2	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	-	NI	HH	HH	HH	HH
K	2	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	-	NI	HH	HH	HH	HH
E67	1A	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	-	NI	HH	HH	HH	HH
K	1A	HH	NI	HH	NI	HH	NI	NI	-	NI	HH	HH	HH	HH
FALL 14														
E75	2	OU	O-	OH	NI	NI	OO	OO	NI	NI	NI	HH	HH	NI
K	2	UU	OU	OO	NI	NI	OO	OO	NI	NI	NI	HH	OH	NI
E78	2	O?	OO	OO	NI	NI	OO	OO	NI	NI	NI	HH	U-	NI
K	2	UU	OU	UU	NI	NI	OU	HU	NI	NI	NI	HH	UU	NI
E79	CA	HH	OO	OO	NI	NI	OO	OO	NI	NI	NI	OO	O-	NI
K	CA	UU	OO	OO	NI	NI	OO	OO	NI	NI	NI	OO	OO	NI
FALL 15														
E73	CA	O	UU	OO	UU	NI	NI	OO	NI	HH	U-	NI	NI	O-
K	CA	UU	UU	OO	UU	NI	NI	OO	NI	HH	UU	NI	NI	--
E83	3	H-	OO	OO	OO	NI	NI	O-	NI	HH	OO	NI	NI	O
K	3	HH	OO	OO	UU	NI	NI	OO	NI	HH	HH	NI	NI	HH
E85	2	H-	OO	HH	OH	NI	NI	HH	NI	HO	HH	NI	NI	HH
K	2	O-	O-	H	O-	NI	NI	HH	NI	H-	H-	NI	NI	HH
E88	2	U-	UH	OO	HH	NI	NI	HH	NI	OO	HH	NI	NI	O-
K	2	UU	UU	HH	HH	NI	NI	HH	NI	HH	HH	NI	NI	OO
FALL 16														

F45	2	HH	NI	OO	NI	NI	NI	HH	HH	NI	NI	HH	NI	HH	
K	2	HH	NI	OO	NI	NI	NI	HH	HH	NI	NI	HH	NI	HH	
F47	1A	HH	NI	HH	NI	NI	NI	HO	HH	NI	NI	HH	NI	HH	
K	1A	HH	NI	HH	NI	NI	NI	HH	HH	NI	NI	HH	NI	HH	
F38	2	UU	NI	OO	NI	NI	NI	H-	UU	NI	NI	UU	NI	OO	
K	2	UU	NI	OO	NI	NI	NI	OH	UU	NI	NI	UU	NI	OO	
F48	2	HH	NI	HH	NI	NI	NI	HH	HH	NI	NI	UU	NI	OO	
K	2	HH	NI	HH	NI	NI	NI	-O	HH	NI	NI	UU	NI	O-	
F35	2	HH	NI	OO	NI	NI	NI	OO	OO	NI	NI	H-	NI	HH	
K	2	HH	NI	UU	NI	NI	NI	HH	OO	NI	NI	HH	NI	H-	
F46	2	HH	NI	HH	NI	NI	NI	OO	HH	NI	NI	H-	NI	UU	
K	2	HH	NI	UU	NI	NI	NI	HH	HH	NI	NI	HU	NI	UU	
F30	3	UU	NI	UU	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	HH	NI	H-	
K	3	UU	NI	UU	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	HH	NI	H-	
F31	3	UU	NI	UU	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	UU	NI	U-	
K	3	UU	NI	UU	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	--	NI	U-	
F32	3	UU	NI	HH	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	HH	NI	OU	
K	3	UU	NI	HH	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	U-	NI	HH	
F33	3	UU	NI	UU	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	HH	NI	OO	
K	3	UU	NI	UU	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	HO	NI	OO	
F34	3	UU	NI	UU	NI	NI	NI	HO	UU	NI	NI	H-	NI	H-	
K	3	UU	NI	UU	NI	NI	NI	HO	UU	NI	NI	H-	NI	H-	
F49	2	HH	NI	HH	NI	NI	NI	H-	HH	NI	NI	H-	NI	UU	
K	2	HH	NI	HH	NI	NI	NI	H-	HH	NI	NI	H-	NI	UU	
F53	CA	UU	NI	UU	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	--	NI	UU	
K	CA	UU	NI	UU	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	--	NI	UU	
F54	CA	UU	NI	UU	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	--	NI	UU	
K	CA	UU	NI	UU	NI	NI	NI	OO	UU	NI	NI	--	NI	UU	
FALL 21															
F26	3	HH	NI	NI	OO	UU	HH	NI	NI			HH	NI	NI	UU
K	3	HH	NI	NI	OO	UU	HH	NI	NI			UU	NI	NI	HH
F28	2	--	NI	NI	OO	UU	OO	NI	NI			HH	NI	NI	OO

K	2	--	NI	NI	OO	UU	OO	NI	NI		SS	NI	NI	OO
F29	3	--	NI	NI	OO	UU	OO	NI	NI		HH	NI	NI	HH
K	3	HH	NI	NI	OO	UU	OO	NI	NI		HH	NI	NI	HH
F24	2	OO	NI	NI	OO	UU	OO	NI	NI		HH	NI	NI	OO
K	2	--	NI	NI	--	UU	HH	NI	NI		HH	NI	NI	UU
F25	3	HH	NI	NI	OO	SS	OO	NI	NI		HH	NI	NI	HH
K	3	OO	NI	NI	OO	--	OO	NI	NI		--	NI	NI	HH
F52	CA	HH	NI	NI	--	UU	OO	NI	NI		OO	NI	NI	OO
K	CA	--	NI	NI	--	HH	OO	NI	NI		OO	NI	NI	OO
	FALL 22													

Tabelle 3.1: Detaillierte Ergebnisse der LOH-Analyse. Hierbei sind nur diejenigen Proben aufgelistet, die paarweise vorhanden und auswertbar waren. In der ersten Spalte sind Läsionenpaare mit interner Durchnummerierung aufgeführt. Die korrespondierenden Gegenproben sind mit ‚K‘ bezeichnet. In der zweiten Spalte wurde die histopathologische Klassifizierung der Proben geschildert. In der zweiten Zeile von oben sind die eingesetzten Marker mit ihrer cytogenetischen Lokalisierung dargestellt. Pro Läsionenpaar und Marker sind vier PCR's (mindestens drei) durchgeführt. Jede Reaktion entspricht einem Symbol (Buchstabe) in der Liste.

- H: heterozygot
 NI: nicht informativ
 O: LOH im oberen Allel
 U: LOH im unteren Allel
 -: kein Amplifikat (Ausfall)
 1A: PANin 1A
 1B: PANin 1B
 2: PANin 2
 3: PANin 3
 ca: Cancer in situ

3.3. Auswertung der LOH-Daten

Insgesamt wurden 364 gangepithelialen Läsionen aus dem Pankreasgewebe von 22 verschiedenen Personen bearbeitet. In 21 Fällen stammte das Material von Personen mit einem nachgewiesenen Pankreas-Tumor. In einem Fall wurden die Läsionen aus einem gesunden Gewebe mit präneoplastischen Gangveränderungen präpariert. Bei allen Proben handelte es sich um archiviertes Paraffin-Material. Der älteste Paraffinblock stammte aus dem Jahre 1996 und der jüngste aus dem Jahre 1999. Bei 204 Proben konnten keine

korrespondierenden Läsionen als Kontrolle zu der DOP-PCR mikrodisssektiert werden. Daher wurden sie bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Von 51 weiteren Läsionen konnte nach der DOP-Amplifizierung kein Produkt generiert werden. Dies läßt sich insofern erklären, daß der Transfer des präparierten Zellareals ins Reaktionsgefäß nicht erfolgreich durchgeführt wurde. 12 Läsionenpaare sind wegen einer hohen Ausfallrate (Amplifikationsrate < 70 %) ausgeschlossen worden. 8 Läsionen wurden aufgrund hoher Kontamination (Stromazellen) ausgeschlossen. Sieben weitere erwiesen sich als histologisch diskordant. Insgesamt konnten 81 Läsionenpaare (Reaktion 1 und 2) ausgewertet werden. Das genomische Material der Proben (Läsionen) wurde durch DOP-PCR vermehrt. Daraus sind anhand der Mikrosatelliten-Marker Fragmente durch PCR generiert worden. Nach der Auftrennung der Produkte in einem PAA-Gel und nach anschließender Visualisierung der Banden durch Silberfärbung wurden bei denjenigen Proben LOH festgestellt, bei denen im Vergleich zu der korrespondierenden Normalprobe (Positivkontrolle) ein Allel fehlte oder eine Signalreduktion von mindestens 50% aufwies. Dieses Auswahlkriterium spielt insofern eine Rolle, da bei der Mikrodisssektion der Epithelzellen nicht immer verhindert werden konnte, daß auch Stromazellen in die Präparation gelangen. Eine 75%ige Signalreduktion bei einem Allel bedeutet eine 50%ige Kontamination mit Normalgewebe, was theoretisch den ungünstigsten Fall darstellen würde. Nach mikroskopischer Überprüfung der Gewebeschnitte auf Anteile der Normalzellen wurden diejenigen Läsionen aussortiert, die den Wert überschritten haben. Die Auswertung der gesamten Proben wurde pro chromosomalem Arm vorgenommen, wenn einer oder mehrere Marker pro Chromosom informativ waren. Ferner wurden die Daten nach Chromosomen entsprechend der histologischen Klassifizierung (*Grading*) und nicht nach Fall (Patient) ausgewertet. In der Tabelle 3.3 ist die LOH-Rate der auswertbaren Läsionen in Korrelation zu histopathologischen Bestimmungen zusammenfassend dargestellt worden.

3.3.1 Klonale Progression der Epithelzellen

Eine genaue Betrachtung der Tabelle 3.2 zeigt, daß einige Fälle ein heterogenes LOH-Muster beinhalten. Im Fall 21 sind beispielsweise zwei Läsionen mit gleichem morphologischen Phänotyp, aber mit genetisch unterschiedlichen Merkmalen (F38 und F48) zu beobachten. Beide Läsionen sind histologisch als dysplastisch (PanIN 2) klassifiziert worden, wobei F38 auf dem Chromosomenarm 9p heterozygot ist und F48 in der gleichen Region eine Deletion aufweist. Folgerichtig ist annehmbar, daß die untersuchten Zellklone von der gleichen epithelialen Mutterzelle stammen, die jedoch in ihrer Entwicklung verschiedene Wege eingeschlagen haben. Andererseits zeigten die hochgradig dysplastischen Läsionen sowie

Krebszellen (PanIN 3 und CIS) in ihren genetischen Veränderungen ein homogenes Bild. Die letztgenannten Zellen zeichnen sich durch ihre hohe Proliferationsaktivität aus. Dieser Wachstumsvorteil dürfte die Folge einer (mindestens) weiteren Gen-Inaktivierung in den betroffenen Zellen (Zellklonen) sein. Dieses Beispiel unterstreicht die These einer klonalen Entwicklung der neoplastischen Zellen (Fearon et al., 1990).

3.3.2 Ausfallrate und Artefakte

Wie aus der Tabelle 3.2 zu entnehmen ist, war es bei einigen Proben nicht möglich, mit den eingesetzten Markern Fragmente zu generieren, die in der Tabelle als Ausfälle definiert sind. Eine Erklärung dafür ist die unzureichende DNA-Qualität bedingt durch die Formalin-Fixierung. Demzufolge wird der DNA-Strang oxidativ degradiert, so daß die DNA in viele sehr kurze DNA-Stränge zerlegt wird. Diese kleinen DNA-Moleküle werden zwar in der DOP-Reaktion vermehrt, besitzen aber häufig nicht die erforderliche Länge für eine erfolgreiche Mikrosatelliten-PCR. Die Ausfälle könnten andererseits auch durch homozygote Deletionen (Verlust beider Allele) verursacht sein. Diese Art der Inaktivierung wurde bislang für das DPC4- und p16-Gen beobachtet (siehe Einleitung) und nicht für das p53-Gen. Da die für das p53-Gen flankierenden Marker eine gleiche Ausfallrate zeigen wie die anderen Marker auf chromosomalen Armen 9p und 18q, erscheinen homozygote Deletionen zumindest nicht für die Mehrzahl der Ausfälle verantwortlich zu sein. Ein weiterer Punkt bei der Auswertung der Daten sind die sogenannten Artefakte. Als Artefakte wurde jede Diskrepanz im Bandenmuster zwischen beiden DOP's bzw. zwischen beiden PCR's derselben DOP-Reaktion definiert. In der Tabelle 3.4 sind die Artefaktenfällen in Abhängigkeit der jeweiligen Marker aufgeführt. Demnach wurde ein Durchschnittswert von 19 % für alle Reaktionen ermittelt. Hierbei wurde allerdings nicht nach Art der Diskrepanz unterschieden. Die ermittelten Daten aus der Tabelle 3.4 zeigen, daß einige Marker häufiger (D9S157 mit 33%) und andere dagegen selten (TP53 mit 7 %) Artefakte bilden. Da die meist chromosomalen Deletionen in den Läsionen mit histologisch höheren Entwicklungsstadien (Dysplasie) ermittelt wurden, war es interessant festzustellen, ob gerade diese Läsionen zu mehr diskordanten Daten tendieren. Bei den meisten Artefakten handelte es sich um konkordante Daten innerhalb einer DOP-Reaktion und diskordante Ergebnisse zwischen beiden Reaktionen. Dies kann durchaus mit der heterogenen Klonalität der Zellareale (Läsionen) erklärt werden, was bei einigen auswertbaren Läsionen mit reproduzierbaren Daten (siehe Abschnitt 3.3.1) beobachtet worden ist.

Marker	Ausfälle		Artefakte		Informativität
D9S304	38/272	14%	9/57	16%	71%
D9S319	21/136	9%	10/32	31%	62%
D9S171	14/272	5%	8/43	19%	57%
D9S157	23/208	11%	15/46	33%	62%
D18S474	16/172	9%	3/36	8%	43%
D18S46	22/167	13%	6/28	21%	38%
D18S363	25/220	11%	13/48	28%	57%
D18S535	17/200	9%	4/42	10%	57%
D18S877	7/156	5%	7/33	21%	48%
D17S786	15/188	8%	5/29	17%	38%
TP53 PCR.15	14/216	7%	3/42	7%	57%
D17S796	38/200	19%	5/24	21%	62%
D17S1832	33/292	11%	10/57	18%	48%
	10.5%		19%		22 Fälle

Tabelle 3.2: Anzahl der Ausfälle und Artefakte in einzelnen Markern sowie ihre Informativitätsrate bei der untersuchten Population (22 Personen) in dieser Studie. Diese Daten wurden aus den gesamten Proben unabhängig von den histologischen Bestimmungen generiert.

Die Diskrepanz zwischen 2 Mikrosatelliten-PCR's, die mit demselben DOP-PCR-Produkt hergestellt wurden, kann die Folge einer limitierten DNA-Menge sein. Durch die geringe Zellzahl einer präparierten Läsion kann es trotz Vermehrung der DNA in der DOP-Reaktion nicht zur Bereitstellung ausreichender Kopien im betreffenden Genomabschnitt kommen, wodurch die nachfolgenden PCR's keine reproduzierbaren Ergebnisse liefern (*allelic size exclusion*-Phänomen). Wie aus der Tabelle 3.5 zu entnehmen ist, betrifft dies die hyperplastischen Läsionen mit flachem oder papilärem Epithel (1A und 1B) in über 50 % der Fälle. Diese Läsionen waren aufgrund ihrer limitierten Zellzahl schwer zu mikrodisektieren.

	Zwischen beiden DOP's		Zwischen beiden PCR's einer DOP-Reaktion		Summe der Artefakte	
1A	2	22%	7	78%	9/52	17%
1B	6	46%	7	54%	13/100	13%
2	26	65%	14	35%	40/183	22%
3	17	77%	5	23%	22/107	20%
ca	9	90%	1	10%	10/72	14%

Tabelle 3.3: Differenzierte Analyse der Artefakten in den untersuchten Läsionen in Abhängigkeit von morphologischen Progressionsstadien. Die Rate der diskordanten Fälle beträgt im Durchschnitt 19 %.

Die LOH-Daten wurden insgesamt sehr streng ausgewertet, um möglichst jegliche falsch positiven Ergebnisse zu vermeiden. Die nach den beschriebenen Kriterien (siehe oben) ausgewerteten Daten sind als real zu bezeichnen, denn die Verteilung der LOH-Rate in Korrelation mit histologischen Befunden ist in den untersuchten Läsionen unterschiedlich. Dies bedeutet kein Zufallsereignis, anderenfalls müßte die Rate bei allen mehr oder weniger gleich sein.

3.4. Korrelation des histopathologischen Progressionsmodells mit der LOH-Frequenz

In den sieben Läsionen mit flacher Epithelschicht (PanIN 1A) wurde in allen drei chromosomalen Armen kein Allelverlust festgestellt. Diese Läsionen sind einerseits morphologisch mit keiner Zellkern-Atypie begleitet und andererseits genetisch scheinbar stabil. In der darauffolgenden Progressionsstufe PanIN 1B betrug die LOH-Rate auf dem Chromosom 9p gleich null, wobei zwei von 10 Proben (17 %) einen Allelverlust auf Chromosom 17p aufwiesen. PanIN 1B ist durch die papilläre (statt flacher) Epithelschicht charakterisiert. Die neuen Nomenklaturen PanIN 1A und 1B wurden bis vor kurzem von WHO (*world health organization*) zusammengefaßt als Hyperplasie bezeichnet. Alle dysplastischen Läsionen mit einer niedrigen Atypie (PanIN 2) zeigten im Durchschnitt ca. 40% LOH für drei chromosomale Abschnitte. Dies kann so interpretiert werden, daß mit Zunahme des Dysplasiegrades (dies betrifft nicht allein die Zellgröße) auch die Instabilität des Genoms zunimmt. Am stärksten ist der Chromosomenarm 17p mit 48 % betroffen. Der Verlust der 17p-Region zeichnet sich durch langsame und kontinuierliche Zunahme in den

beiden darauffolgenden Stadien (PanIN 3 mit hochgradiger Atypie und CIS) aus. Eine wesentliche Steigerung der LOH-Rate ist bei den Abschnitten 9p und 18q in den zuletzt genannten Läsionen zu verzeichnen (Details siehe Tabelle 3.4).

Die LOH-Daten demonstrieren, daß der Verlust vom Chromosomenarm 17p ein frühes genetisches Ereignis ist. Das Tumorsuppressorgen p53 in dieser Region scheint die Tumorprogression in den Gängepithelien des Pankreas von den hyperplastischen zu den dysplastischen Zellen zu begünstigen. Jedoch ist es wahrscheinlich, daß für die weitere Entwicklung der Zellen zu malignen Tumoren die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p16 und DPC4 notwendig ist. Ferner liefert die Abbildung 3.7 den entscheidenden Beweis dafür, daß die epithelialen Gangzellen im Pankreas die Vorläuferläsionen darstellen (siehe unten).

Summe der Läsionen	Histologie	Chromosom 9p	Chromosom 18q	Chromosom 17p
8	PANin 1A (WHO 0)	0/7	0/6	0/7
15	PANin 1B (WHO 0)	0/12	1/14	2/12
29	PANin 2 (WHO 1&2)	7/23	8/24	13/25
17	PanIN 3	13/15	14/16	6/10
12	CIS	8/8	9/11	10/11
81				

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der LOH-Daten der analysierten Läsionen nach ihrer histologischen Klassifizierung. Die Zahlen in den Spalten bedeuten das LOH-Vorkommen im Verhältnis zu der absoluten Zahl von auswertbaren Proben pro chromosomalem Arm.

3.5. Akkumulative Inaktivierung der Tumorsuppressorgene

Werden chromosomale Verluste in derselben Läsion (soweit alle drei auswertbar sind) in Verbindung miteinander und unter Berücksichtigung histologischer Progressionsstadien analysiert, wird deutlich, daß die Deletionen und die daraus folgenden Geninaktivierungen in einer zeitlichen Abfolge geschehen (Abb. 3.8). Darüber hinaus geht aus der Analyse hervor, daß die Entwicklung der neoplastischen Gängepithelien bis hin zum Krebs scheinbar durch einen akkumulativen Prozeß gesteuert wird, indem mindestens drei Gene inaktiviert sind (72% der Krebsläsionen zeigen in allen drei chromosomalen Armen Deletionen).

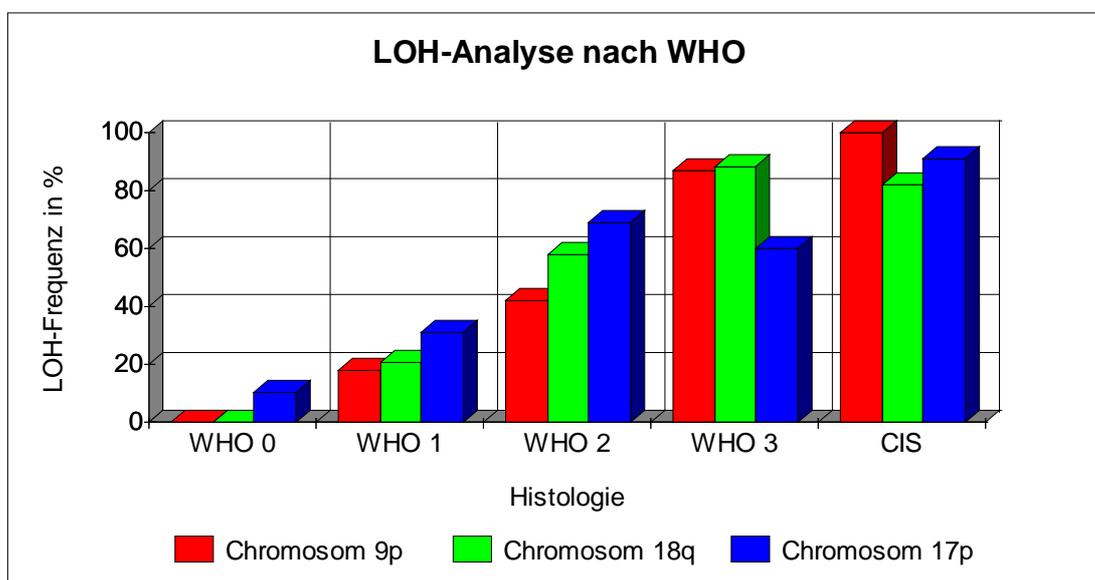
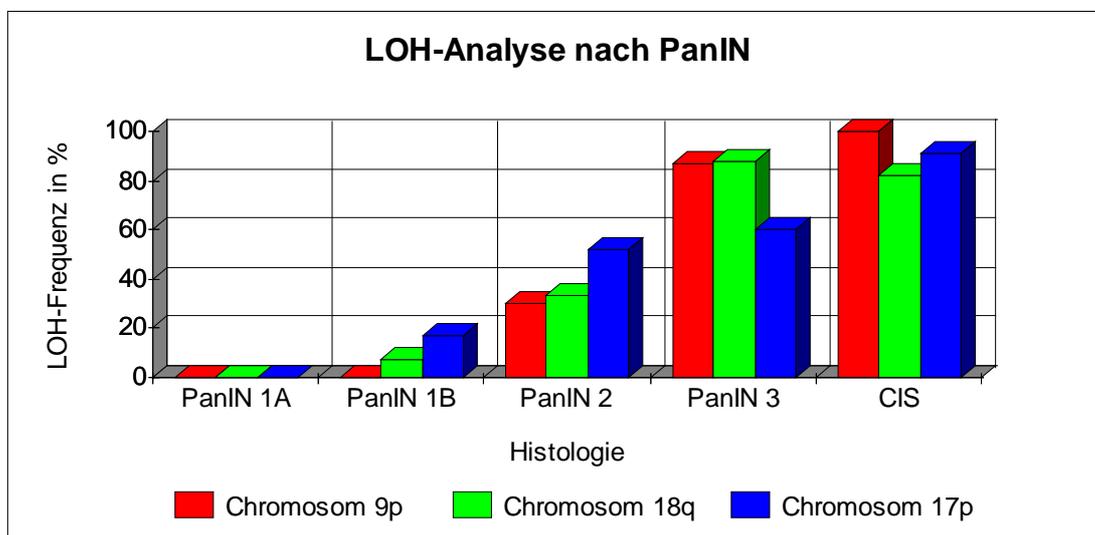


Abb. 3.8: Darstellung der Daten aus der Tabelle 3.4 in einem Säulendiagramm. Auf der X-Achse sind Läsionen nach der Histologie aufgeführt. Die Y-Achse zeigt die prozentuale LOH-Häufigkeit der entsprechenden Proben. Die Daten wurden zusätzlich nach der alten Klassifizierung (WHO) im unteren Diagramm analysiert, um die Unterschiede bezüglich der LOH-Rate zu verdeutlichen. PanIN 1A und 1B entsprechen dem WHO 0, PanIN 2 dem WHO 1 und WHO 2, PanIN 3 = WHO 3.

Die hyperplastischen Läsionen PanIN 1A und PanIN 1B weisen keine chromosomalen Deletionen auf. Hingegen ist eine 60%ige LOH-Rate schon bei den dysplastischen Epithelzellen mit geringer Atypie zu verzeichnen. Dabei besitzen 40 % der Läsionen mindestens ein Hit³ (siehe Tabelle 3.5). In dem darauffolgenden Progressionsstadium zeigen alle Proben ausnahmslos mindestens ein Hit. 61 % von ihnen besitzen 2 Hits und 26 % drei Hits. Anhand dessen wird deutlich, daß eine morphologische Veränderung des Zellkerns einen Hinweis auf genetische Instabilität der betroffenen Zellen geben kann.

	PANin 1A	PAN 1B	PANin 2	PANin 3	CIS
0xHIT's	6/6	10/10	7/19	0/8	0/7
1xHIT's	0/6	0/10	8/19	1/8	1/7
2xHIT's	0/6	0/10	2/19	5/8	1/7
3xHIT's	0/6	0/10	2/19	2/8	5/7

Tabelle 3.5: Häufigkeit der genetischen Ereignisse (HITs) in den Läsionen, in denen alle drei chromosomale Abschnitte auswertbar waren.

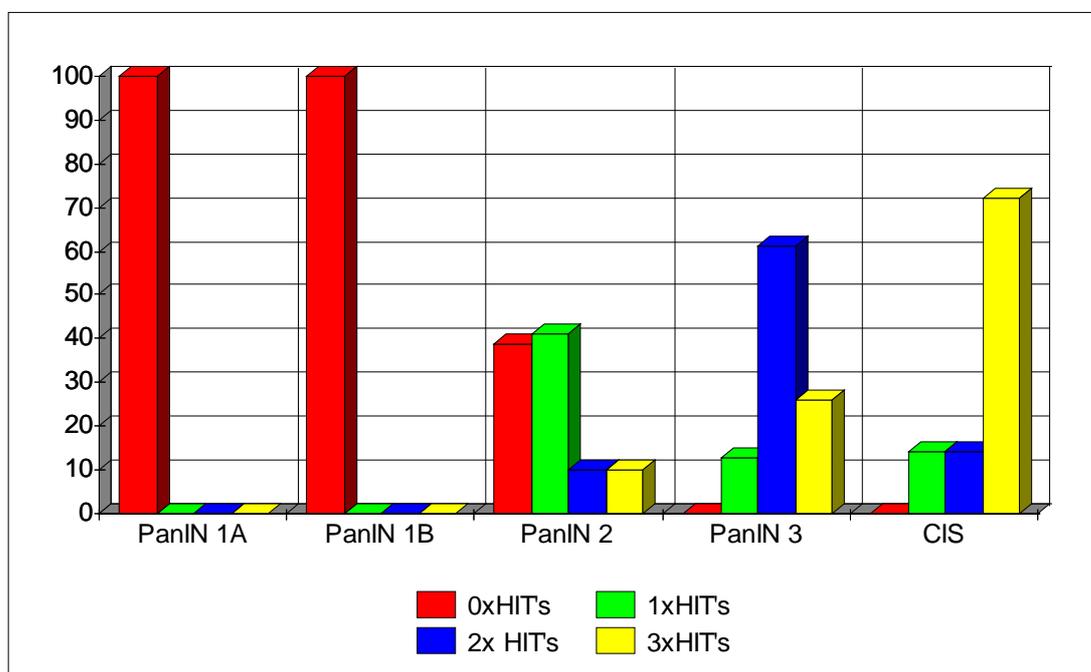


Abb. 3.9: Prozentuale Häufigkeit der LOH-Rate in Abhängigkeit von Chromosomenabschnitten und morphologischen Progressionsstadien. Die dazugehörigen Werte sind in der Tabelle 3.5 aufgelistet.

³ Als Hits wurden Deletionen auf dem jeweiligen chromosomalen Arm bezeichnet. Demzufolge besitzen Läsionen drei Hits, wenn alle drei Chromosomenarme 9p, 17p und 18q in denselben Läsionen deletiert sind.

3.6. Nachweis von DPC4- und p53-Genprodukten mittels Immunhistochemie

Das p53-Genprodukt besitzt eine relativ kurze Halbwertszeit (ca. 20 Minuten). Daher ist der Nachweis dieses Proteins in einem gesunden Gewebe bedingt durch einen raschen Abbau nicht möglich. Anders verhält sich das mutierte Protein. Mutationen bewirken eine Konformationsänderung dieses Genproduktes, die zu einem verlangsamten Abbau dieses Proteins führt. Dies verursacht die Akkumulation des p53-Proteins in den betroffenen Zellen. Diese Eigenschaft wurde in dieser Arbeit genutzt, um mittels eines Antikörpers das mutierte Protein nachzuweisen. Ferner wurden anhand dieser Technik die Expression des DPC4-Wildtyp-Proteins in den untersuchten Läsionen verfolgt. Zuvor wurde mittels LOH-Analyse die heterozygote Deletion einer der beiden Genkopien in den Gangepithelzellen bestimmt. So könnte der fehlende Nachweis des DPC4-Proteins ein Hinweis auf die Inaktivierung des zweiten Wildtyp-Allels sein, da Mutationen normalerweise in diesem Gen einen Expressionsverlust auslösen. Das DPC4-Gen codiert für ein 64 Kd Protein (Liu et al., 1997). Dieses Genprodukt besitzt drei unterscheidbare Domänen: DNA-Bindungsdomäne, eine Domäne zur transkriptionellen Aktivierung und eine Domäne, die für eine Zellkern-Translokation notwendig ist. Mutationen in all diesen Domänen können zu einem Funktionsverlust des Proteins führen (De Winte et al., 1997). Die Sensitivität dieser Antikörper-Markierung wurde in einer bereits publizierten Studie verifiziert (Robb et al., 2000). Dabei wurde die Abwesenheit des DPC4-Proteins in denjenigen Proben bestätigt, in denen zuvor die Deletion eines Allels kombiniert mit einer Mutation im zweiten Allel bestimmt worden war.

Hierzu sind die erzielten Daten in der Tabelle 3.6 aufgeführt. Als Kontrolle für die p53-Expression eignen sich die umliegenden normalen Stromazellen, denn in diesen Zellen wird kein p53-Protein exprimiert. Im Falle des DPC4-Genproduktes wurden die Inselzellen als Positivkontrolle eingesetzt. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die Akkumulation des p53-Proteins in den Gangepithelien proportional mit den steigenden Entwicklungsstadien zunimmt, was auf eine steigende Mutationsrate im p53-Gen hinweist. Dennoch fällt auf, daß der Läsionstyp PanIN2 eine weitaus niedrigere Mutationsrate im p53-Gen im Vergleich zu den Ergebnissen aus der 17p13- LOH-Analyse zeigt.

Im Falle des DPC4-Proteins konnte bei den Läsionstypen PanIN1A und 1B in allen untersuchten Proben die Expression des Proteins nachgewiesen werden. In 13 % der PanIN2-Läsionen wurde die Abwesenheit des Proteins beobachtet. Dies steigt in PanIN3-Läsionen auf 41 % an und erreichte in Karzinom-Läsionen 50 %. Der Vergleich dieser Daten mit den

Ergebnissen aus der LOH-Analyse des 18q21.1-Locus zeigt eine ähnliche Zunahme der Inaktivierung dieses Gens, wie für p53 beobachtet (siehe Abb. 3.10).

PanIN	Ca	Ca	Ia	Ia	Ib	Ib	II	II	II	II	III	III
WHO	Ca		WHO 0				WHO 1		WHO 2		WHO 3	
Fall	p53	DPC4	p53	DPC4	p53	DPC4	p53	DPC4	P53	DPC4	p53	DPC4
1	neg	pos	0/1	2/2	0/1	2/2	0/1	2/2	0/6	2/2	-	1/1
2	pos	neg	0/1	3/3	0/2	2/2	-	-	1/2	1/2	1/1	1/1
3	neg	neg	-	3/3	0/1	2/2	0/1	1/1	-	0/1	0/4	1/4
4	pos	neg.	0/1	4/4	0/1	2/2	1/2	2/2	-	2/2	1/4	1/2
5	Neg	neg	0/6	5/5	0/2	2/2	0/1	1/1	-	2/2	0/4	1/3
6	pos	neg	0/4	4/4	-	-	0/1	1/1	0/1	2/3	2/3	2/3
7	neg	neg	0/3	2/2	0/7	6/6	-	1/1	-	0/1	-	0/1
8	neg	neg	0/1	3/3	0/3	2/2	-	-	0/4	2/2	-	-
9	pos	pos	0/3	1/1	0/3	1/1	0/1	1/1	-	-	-	-
10	pos	-	-	3/3	0/4	2/2	0/1	1/1	0/1	1/1	-	-
11	pos	-	0/2	5/5	0/11	5/5	0/1	-	0/1	-	-	-
12	neg	neg	0/1	3/3	0/5	3/3	-	1/1	-	2/2	0/1	1/1
13	pos	Pos	0/3	2/2	0/3	2/2	-	3/3	1/1	3/3	1/1	3/3
14	pos	Pos	-	2/2	0/1	2/2	1/2	2/2	2/3	2/2	1/1	2/2
15	pos.	pos	-	2/2	0/3	2/2	0/3	2/2	0/3	1/1	1/3	0/1
16	pos	Pos	-	1/1	0/1	-	0/1	1/1	0/4	1/1	5/7	1/3
17	pos	pos	-	-	0/1	-	-	-	0/1	-	-	-
18	pos	Pos	-	2/2	0/2	2/2	0/4	4/4	0/2	3/3	-	3/3
19	pos	pos	-	2/2	0/2	2/2	-	-	0/2	3/3	-	3/3
20	pos	neg	0/6	2/2	0/6	2/2	-	-	0/2	-	4/5	0/3
21	neg	-	0/1	-	0/3	-	0/3	-	0/3	-	0/5	-
Imm. Hist.+	14/21	9/18	0/33	51/51	0/62	41/41	2/22	23/23	4/36	27/31	16/39	20/34
Imm. hist. -	7/21	9/18	33/33	0/51	62/62	0/41	20/22	0/23	32/36	4/31	23/39	14/34
Verlust	66%	50%	0%	0%	0%	0%	9%	0%	11%	13%	41%	41%

Tabelle 3.6: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen anhand monoklonaler Antikörper gegen das p53- bzw. DPC4-Proteins. Im Falle des p53-Proteins weist der Nachweis des Antigens (hier als positiv bezeichnet) auf eine Mutation hin. Beim DPC4-Protein deuten die negativen Fälle jedoch indirekt auf eine Mutation in den jeweiligen Läsionstypen hin. Die Felder ohne Zahlen (-) bedeuten, daß diese Läsionstypen nicht analysiert wurden.

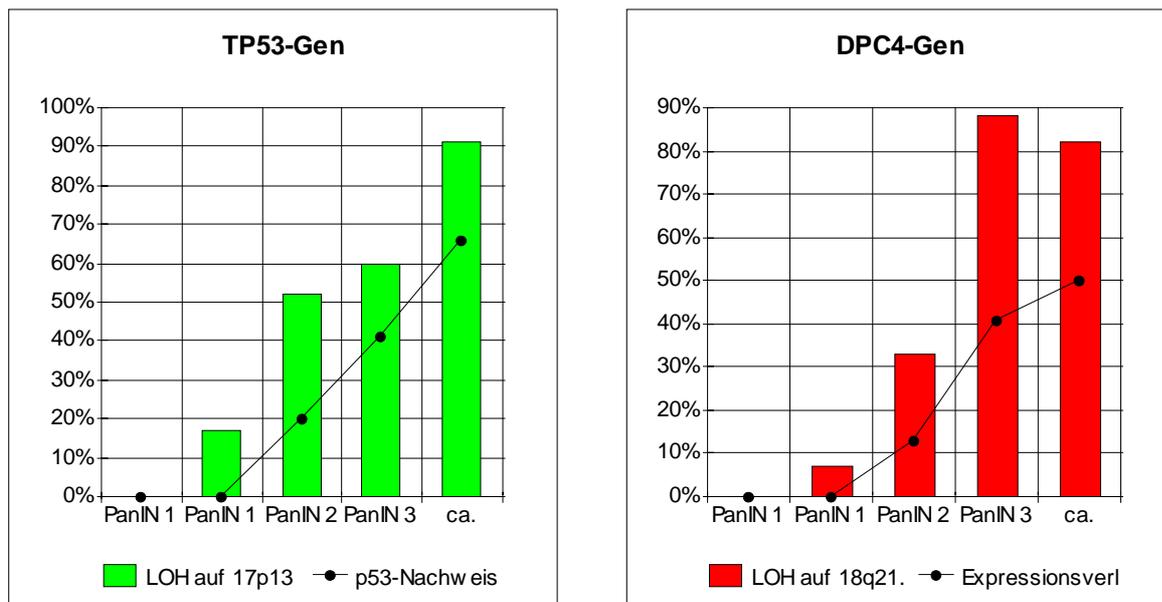


Abb. 3.10: Vergleich der Daten aus der LOH-Analyse und immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis der Expression in den DPC4- bzw. p53-Genen.

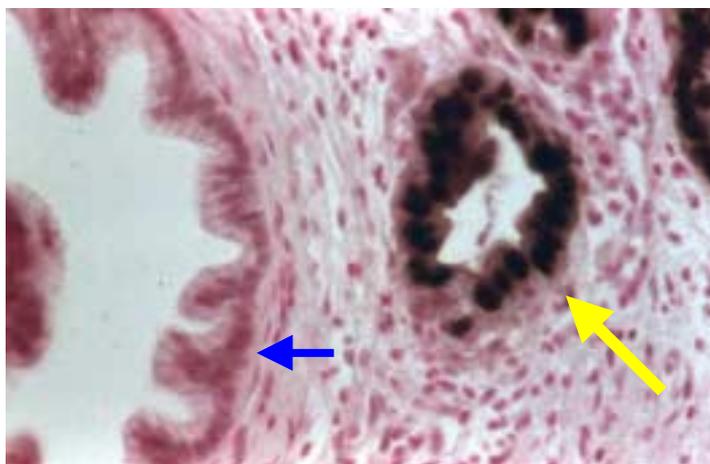


Abb. 3.11: Immunhistochemische Färbung mittels Vectastain-ABC-Methode. Durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers wurde das p53-Protein in den Gangläsionen nachgewiesen. Das Bild zeigt hier die Überexpression des p53-Proteins in einer dysplastischen Läsion durch die braune Färbung der Zellkerne (der gelbe Pfeil). Die in der Nachbarschaft gelegene Läsion mit einem hyperplastischen Charakter (der blaue Pfeil) zeigt dagegen keine Immunreaktion.

3.7. Mutationsanalyse vom K-ras-Gen

Eine der häufigsten genetischen Veränderungen in den Pankreas-Tumoren ist die Punktmutation im K-ras-Gen (codon 12 und 13). In den duktalem Adenokarzinomen des Pankreas hat man die höchste Mutationsrate (70-100 %) gefunden (Grünewald et al., 1989; Klöppel et al., 1994; Hruban et al., 1993). Auch in hyperplastischen Läsionen ist von einer beachtlichen Mutationsrate von 36 % berichtet worden (Lüttges et al., 1999). Es gibt allerdings wenig Studien, in denen die Rolle von Ras-Mutation im Zusammenhang mit chromosomaler Deletion systematisch untersucht worden ist. Aus diesem Grund wurden für die Mutationsanalyse dieselben Proben wie bei der LOH-Analyse verwendet (Durchführung siehe Material und Methoden). Aus 81 Läsionenpaaren konnten 65 Proben ausgewertet werden. Aus den restlichen 16 Läsionen konnten keine Fragmente generiert werden. Insgesamt wurden in 26 Läsionen (43 %) Mutationen in den codons 12 und 13 gefunden. Ferner wurden Mutationen am häufigsten in den Krebszellen (Karzinom mit 73 %) und am seltensten in den Läsionen mit einer flachen Epithelschicht (PanINin 1A mit 25 %) beobachtet. In den dysplastischen Läsionen sind in gleicher Frequenz Mutationen gefunden worden (siehe Tabelle 3.6). Bei einigen Läsionen wurden zwei Mutationen im Codon 12 gefunden. In einer Karzinom-Läsion handelte es sich um eine Mutation im Codon 13. Dies geschah durch eine Transversion (G nach C) in der ersten Base. Dies führte zu einer Aminosäure-Substitution von Glycin (GGC) nach Alanin (CGC). In allen anderen Läsionen beschränkte sich die Punktmutation auf Codon 12. Sie zeigten allerdings in der Art der Mutation ein heterogenes Muster. In 9 Fällen verursachte eine substitutive Transition einen Aminosäure-Austausch von Valin (Wildtyp: GGT) nach Aspartat (mutiert: GAT). Neun weitere Mutationen wurden dem Austausch von Valin nach Phenylalanin (GTT) zugeschrieben. Zuletzt wurden in acht Läsionen Mutationen im Codon 12 mit der Sequenz CGT (Alanin) und in drei weiteren mit der Sequenz GCT (Arginin) nachgewiesen. In zwei Läsionen mit Mutationen im Codon 12 zeigten die korrespondierenden Proben jeweils keine Mutation (siehe Tabelle 3.8). Ferner zeigten 60 % der Läsionen mit der Mutation im Ras-Gen gleichzeitig auch eine Deletion im 17p-Locus. Ein weiterer interessanter Punkt bei einigen Proben ist die Beobachtung der Punktmutation in einem Allel und der Deletion im zweiten Allel, so daß kein Signal vom Wildtyp sichtbar ist (siehe Abb. 3.9 unteres Sequenz-Bild). In anderen Proben, in denen nur ein Allel mutiert ist, ist noch das Wildtyp-Signal vorhanden. Das Verhältnis der beiden Banden gibt einen Hinweis auf den Anteil des mutierten und des Wildtyp-Allels.

Histologie	WILDTYP		Mutation (Codon 12)	
	PanIN 1A	3/4	75%	1/4
PanIN 1B	6/9	67%	3/9	33%
PanIN 2	15/24	62%	9/24	38%
PanIN 3	10/17	59%	7/17	41%
Karzinom	3/11	27%	8/11	73%

Tabelle 3.7: Die Daten aus der Mutationsanalyse im Ras-Gen. Die mutierten Läsionen sind hierbei nach ihrer Histologie aufgelistet worden.

FALL	LÄSION-NR.	HISTO.	SEQUENZ IN CODON 12
1	E15	2	GGT
	E16	2	GGT
2	X10	1B	GGT
	X17	2	GGT
3	X46	1A	GAT
4	A29	1B	GGT
	A30	2	GGT
	A42	CA.	GAT
5	E35	1B	GGT
	E36	1B	GAT
	E38	CA.	GTT
6	E3	CA.	GTT
7	E75	2	GTT
	E78	2	GTT
	E79	CA.	CGT
8	X28	3	CGT
9	X61-E27	2	GTT-GGT
10	X89	1B	GCT
	X85	CA.	CGT
11	A11	2	GAT
	A13	2	GGT
	A25-E54	1B	GAT-GGT
	E10	1B	GGT
	E9	2	GGT
	E7	1B	GGT
12	E5	2	GGT
	E63	1A	GGT
	E64	1B	GGT

	E65	2	CGT
	E67	1A	GGT
13	F15	CA.	GGT
14	E83	2	GAT
	E73	CA.	GTT
	E85	3	GGT
15	F6	2	GGT
	F7	CA.	CGT
16	E90	3	GGT
	E91	3	GGT
	E92	3	GAT
	E93	3	CGT
17	F45	2	GGT
	F47	1A	GGT
	F38	2	GAT
	F48	2	GGT
	F46	2	GAT
	F35	2	GAT
	F30	3	GGT
	F31	3	GGT
	F32	3	GGT
	F33	3	GGT
	F34	3	GGT
	F49	2	GGT
	F53	CA.	CGG (CODON 13)
18	F54	CA.	GTT
19	F17	3	GTT
	F18-K	2	CGT-GTT
	F19	3	GGT
	F20	3	GGT
	F21	2	GGT
	F52	CA.	GGT
	F26	3	CGT
	F24	2	GGT
	F29	3	GCT
	F28	2	GGT
	F27	3	GCT

Tabelle 3.8: Detaillierte Darstellung der Ergebnisse aus der Mutationsanalyse im Ras-Gen. Drei Läsionspaare mit jeweils unterschiedlichen Mutationen sind hier aufgelistet. Alle anderen korrespondierenden Proben mit gleichem Ergebnis wurden nur einzeln dargestellt. In der vierten Spalte sind die mutierten Sequenzen sowie der einzige Fall mit der Mutation im codon 13 fett dargestellt.

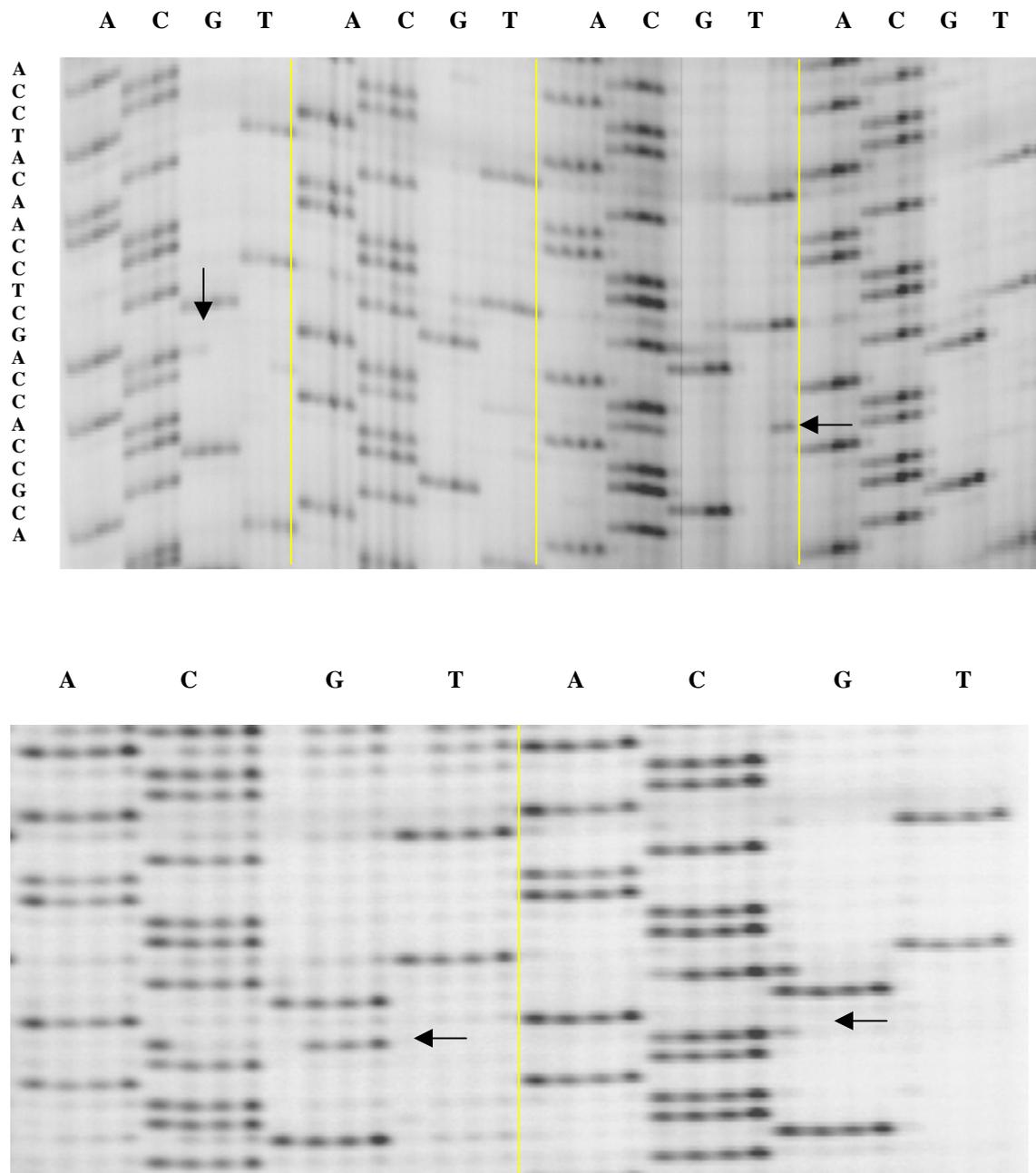


Abb. 3.12: Die Abbildung zeigt die partielle Sequenz vom K-ras-Gen in den untersuchten Proben aus den Ganglions. Hierbei sind die mutierten Banden im Codon 12 mit einem Pfeil markiert. In der oberen Abbildung sind 16 verschiedene Proben zu sehen. Läsionenpaare sind dabei nebeneinander aufgetragen worden. Im unteren Teil sind insgesamt 8 Proben abgebildet. Alle vier Proben sind jeweils durch eine Linie gekennzeichnet worden. Bei dieser Sequenz handelt es sich um die Gegenstrang-DNA von Exon 1.

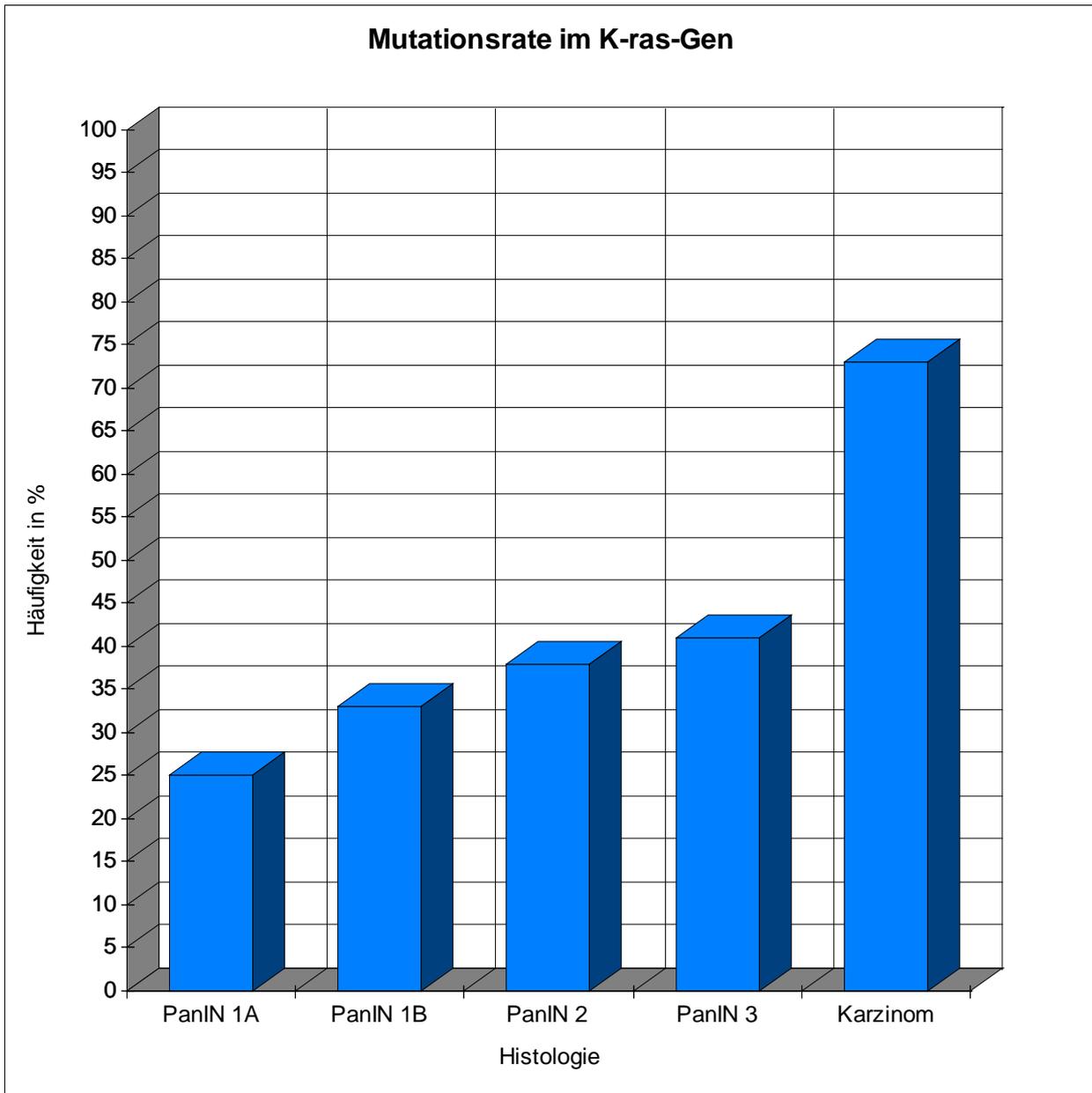


Abb. 3.13: Graphische Darstellung der Daten aus der Ras-Mutationsanalyse. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Läsionen mit entsprechender histologischer Klassifizierung aufgeführt.

4. DISKUSSION

4.1. Epidemiologie des Pankreaskrebs

Der Bauchspeicheldrüsenkrebs stellt in zunehmendem Maße ein öffentliches Gesundheitsproblem dar. Seine Häufigkeit nimmt stetig zu, allein im Jahr 1995 wurden in Deutschland elftausend Neuerkrankungen registriert. Inzwischen wird jeder 5. Krebstod in Deutschland durch ein Pankreaskarzinom verursacht (Silverman et al., 1995; Koch, 1996). Nur in seltensten Fällen überleben die Patienten 5 Jahre nach Diagnosestellung (Silverman et al., 1995), andererseits belegen neuere Studien inzwischen eine bessere Prognose, wenn der Tumor im Frühstadium operiert werden kann (Thorlacius et al., 1996). Die Ursache des Pankreaskarzinoms ist nach wie vor unzureichend geklärt. Obwohl umfangreiche Studien zu Risikofaktoren wie Alkohol, fettreiche Ernährung, Kaffee, Zigarettenrauch und Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien durchgeführt wurden (Durbec et al., 1983; Falk et al., 1988; Ghaddirian et al., 1994; Gullo et al., 1994; Lowenfels et al., 1993; Spielman et al., 1993), ist der einzig sichere umweltbedingte Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms das Zigarettenrauchen. Der Diabetes mellitus, eine chronische Bauchspeicheldrüsenentzündung, schwarze Hautfarbe und männliches Geschlecht spielen möglicherweise eine Rolle. Einer familiären Veranlagung wurde bis vor kurzem nur wenig Bedeutung zugemessen. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß lange Zeit bei vielen Krebspatienten die Familiengeschichte nur unzureichend erfragt wurde (David et al., 1991; Lynch, 1991). Neben der isolierten familiären Häufung von Pankreaskarzinomen, deren Ursache immer noch unbekannt ist, gibt es einige hereditäre Erkrankungen bzw. familiäre Krebs syndrome, die zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms prädisponieren. Hierzu zählen die vererbte Bauchspeicheldrüsenentzündung (Hereditäre Pankreatitis), die Ataxia teleangiectatica, das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC), das Li-Fraumeni-Syndrom, das Gardner-Syndrom, das kürzlich entdeckte Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom, das Peutz-Jeghers-Syndrom sowie eine bestimmte Form des vererbten Brustkrebses (Comfort et al., 1952; Madrazo et al., 1993; McKusick et al., 1990; Lynch et al., 1993; Li et al., 1969; Johan et al., 1992; Bartsch et al., 1995; Phelen et al., 1996). Es wird geschätzt, daß etwa 3-5 % aller Pankreaskarzinome auf einer vererbten Anlage beruhen (Lynch, 1994).

4.2. Histopathologie der duktaalen Gangepithelien

Krebs der Bauchspeicheldrüse ist eine heterogene Erkrankung. Endokrine Zellen machen 90% der Zellmasse in diesem Organ aus, sind jedoch selten vom Krebs betroffen. Das Insulinom ist beispielsweise eine Krebsart der Insulin-produzierenden endokrinen Zellen¹. Mehr als 90% aller malignen Pankreastumoren gehen allerdings von exokrinen Gangepithelien aus, die weniger als 10% der Pankreaszellmasse ausmachen. In 60% der Fälle ist der Tumor im Kopf der Bauchspeicheldrüse lokalisiert (Cubilla et al. 1984)².

Unter epithelialen Tumoren versteht man Geschwülste aus Abkömmlingen des äußeren und inneren Keimblattes. Über die Einordnung in das Klassifikationssystem entscheidet sowohl Herkunft als auch Anordnung der Zellen zusammen mit dem Differenzierungs- und Wachstumsgrad. Die maligne Potenz von Tumoren bezieht sich auf verschiedene histologisch faßbare Eigenschaften. Derartige Merkmale orientieren sich an dem allgemeinen Prinzip, daß Tumoren eine schrittweise Entstehung aufweisen, die von neoplastischen Vorstadien³ bis hin zur Entdifferenzierung reicht (Donhuijsen, 1998). Einige Hinweise deuten darauf hin, daß sich auch die epithelialen Pankreastumoren in ihrer Entwicklung ähnlich verhalten (Brat et al., 1998). Hierbei können aus morphologischer Sicht verschiedene Entwicklungsstadien beobachtet werden, die als Tumor-Vorläuferläsionen postuliert werden (Hruban et al., 2000).

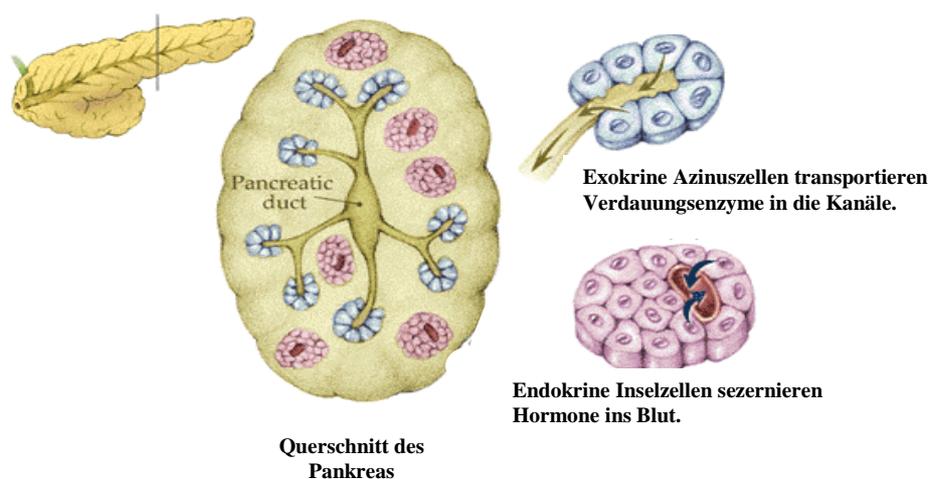
Ein allgemein akzeptiertes Modell der WHO (*world health organization*) unterteilt die Läsionen der exokrinen Gangepithelien in fünf histomorphologisch differenzierbare Kategorien⁴: Klasse 0) Läsionen mit flacher oder papillärer Epithelstruktur ohne Zellkernatypie, Klasse 1) papilläre Epithelien mit geringer Atypie, Klasse 2) Läsionen mit mittelgradiger Atypie, Klasse 3) Epithelzellen mit hochgradiger Zellkernatypie und schließlich Klasse 5) Karzinom mit einer diffusen Epithelstruktur. Mit dem Ziel der Vereinheitlichung hat man sich im Rahmen eines kürzlich abgehaltenen Expertentreffens für diese Läsionen auf den Namen „*Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie*“ (PanIN) geeinigt und für die histomorphologisch unterschiedlichen Läsionen eine neue Nomenklatur eingeführt. Danach werden vier Läsionstypen unterschieden: PanIN1A: hyperplastische duktaale Epithelzellstruktur (entspricht der Klasse 0 nach WHO), PanIN1B: Läsionen mit einer

¹ Diese spezialisierten Zellen werden Langerhans'sche Inselzellen genannt.

² Die Bauchspeicheldrüse wird anatomisch in Kopf (head), Körper (body) und Schwanz (tail) eingeteilt.

³ Die Begriffe ‚Neoplasie‘ (Neubildung) und ‚Tumor‘ werden im allgemeinen synonym verwendet. Man versteht darunter die abnorme Vergrößerung eines Gewebes, welches durch autonome und progressive Proliferation körpereigener Zellen entsteht. Der Begriff ‚Krebs‘ steht für maligne Tumoren, die sich von benignen Tumoren durch infiltratives und destruktives Wachstum sowie durch die Fähigkeit zur Metastasierung unterscheiden.

papillären Epithelstruktur und fehlenden Dysplasie (Klasse 0 nach WHO), PanIN2: papilläre Läsionen mit geringgradiger Dysplasie (Klasse 1 & 2 nach WHO) und PanIN3: papilläre Läsionen mit hochgradiger Dysplasie. Bei der Auswertung der Daten wurden beide Klassifizierungen berücksichtigt, um erstens eine bessere Auflösung der Läsionen zu erreichen und zweitens die genetischen Veränderungen in Korrelation zu dem jeweiligen Läsionstyp besser interpretieren zu können.



4.3. Nachweis chromosomaler Deletion durch Mikrosatelliten-Marker und deren Bedeutung in der Tumorphathogenese

Ein Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, den Verlust der Heterozygotie (LOH) in Korrelation zu histopathologischen Entwicklungsstadien zu bestimmen. Bei dieser Art von Analysen können kleine chromosomale Deletionen mit Hilfe der sogenannten Mikrosatelliten-Marker nachgewiesen werden.

Mikrosatelliten sind ein Spezialfall der sequenzmarkierten Stellen (*sequence tagged sites*, STS). Dies sind repetitive DNA-Sequenzen, die im Genom nur einmal vorkommen, d.h. sie sind locusspezifisch. Im Falle der polymorphen Mikrosatelliten sind die Primersequenzen in der Gesamtpopulation konserviert, die dazwischenliegenden repetitiven Sequenzabschnitte variieren jedoch in ihrer Länge. So erhält man bei der Amplifikation ein allelspezifisches PCR-Produkt. Diese allelischen Unterschiede können dann so als genetische Marker eingesetzt werden. Diese Marker enthalten kurze Folgen repetitiver Einheiten. Diese haben

⁴ Solche Klassifizierungen beruhen zum einen auf Vereinbarungen, zum anderen auch auf histogenetischen Ableitungen. Da das Fortschreiten der Forschung stets neue Erkenntnisse bringt, sind auch diese WHO-Einteilungen noch nicht endgültig.

einfache, meist ein bis vier Basenpaare lange Sequenzen und sind über das gesamte menschliche Genom verteilt. Bei den repetitiven Einheiten aus einem Nukleotid handelt es sich häufig um Folgen von A und T. Sie machen zusammen etwa 10 Mb oder 0,3 % des Kerngenoms aus. Sequenzfolgen von G und C sind dagegen seltener. Einheiten aus zwei Nukleotiden enthalten oft Folgen von CA bzw. TG auf dem komplementären Strang. 0,5 % des Genoms besteht aus diesen repetitiven Einheiten. Repetitive Einheiten aus Tri- und Tetranukleotiden kommen im menschlichen Genom seltener vor, sind jedoch oft hochpolymorph.

Welche Funktion die Mikrosatelliten-DNA hat, ist unbekannt. Man findet diese Wiederholungen in der Regel in den Introns der Gene, gelegentlich jedoch auch in codierenden Gensequenzen. Deletionen von wenigen Basen finden sich bevorzugt in diesen repetitiven DNA-Sequenzen. Im Verlauf der DNA-Replikation liegt die DNA an die Replikationsgabel einzelsträngig vor. In dieser Situation können sich repetitive DNA-Sequenzen gegeneinander verschieben. Dadurch bildet sich eine einzelsträngige DNA-Schleife (*loop*). Wird diese Schleife durch DNA-Reparaturenzyme entfernt, ergibt sich in einem der beiden Doppelstränge eine Deletion. Der Verlust der Heterozygotie kann auch durch eine mitotische Rekombination oder ‚*chromosomal nondisjunction*‘ verursacht sein (Weinberg, 1991), so daß ein Allel verloren geht, das sich in der Nähe eines Tumorsuppressorgens befindet. Wenn beispielsweise der Patient heterozygot für einen bestimmten Marker war, verliert das Tumorgewebe die Heterozygotie und wird homozygot. Homozygote Deletionen, d.h. der Verlust beider Allele, sind in Tumorzellen selten, jedoch hat man dieses Phänomen bei Pankreastumoren in zwei Tumorsuppressorgene p16 und DPC4 beobachtet. Bei dem letzteren hat dies zur Entdeckung des Gens geführt (Hahn et al., 1997; Caldas et al., 1997).

In dieser Arbeit wurden die duktaalen Pankreasläsionen nach ihren neoplastischen Charakteristika sortiert auf die Häufigkeit chromosomaler Deletionen untersucht, da diese Läsionen derzeit als Vorläufer des Pankreaskarzinoms postuliert werden. Bei dieser Untersuchungsreihe wurden die häufig in Pankreastumoren deletierten Regionen auf den Chromosomenarmen 9p, 17p und 18q analysiert. Es wurde in der Vergangenheit gezeigt, daß innerhalb dieser Loci Tumorsuppressorgene liegen, die häufig bei Pankreaskarzinomen inaktiviert sind. Bei der Durchführung der LOH-Analyse wurden insgesamt 13 Marker auf den oben genannten Gen-Loci eingesetzt. Diese waren in den 22 untersuchten Fällen im

Durchschnitt zur Hälfte informativ⁵, d.h. die elterlichen Allele besaßen unterschiedliche Längen und waren somit auswertbar. Um eine möglichst gute Korrelation der Deletionen mit den bekannten Tumorsuppressor-Genloci zu haben, wurden Marker verwendet, die auf den jeweiligen Chromosomenarmen in möglichst geringem Abstand zu diesen Genloci liegen (siehe Abb. 3.5).

4.4. *In vitro*-Vermehrung des Genoms

Eine wichtige Voraussetzung für die molekulare Analyse des Tumormaterials ist die Homogenität der zu untersuchenden Zellpopulation (Emmert-Buck et al., 1996). Um beispielsweise chromosomale Mikrodeletionen erfolgreich zu detektieren, müssen die neoplastischen Zellen einen Anteil von mehr als 70 % der Gesamtmasse ausmachen (Boehm et al., 1997). Zu diesem Zweck wurde in dieser Studie die Technik der ‚Mikrodissektion‘⁶ eingesetzt (siehe Material und Methoden), um falsch negative Ergebnisse aufgrund einer Normalzell-Kontamination auszuschließen. Da die mit Hilfe der Mikrodissektion gewonnenen Zellzahl nicht ausreichend war, um genügend DNA für die geplante Anzahl an Analysen zu generieren, mußte die genomische DNA zunächst *in vitro* repräsentativ vervielfältigt werden. Hierfür wurde die Methode ‚*degenerate oligonucleotide primed-PCR*‘ (DOP-PCR) ausgewählt. Die Methode wurde an unseren Anforderungen angepaßt und soweit optimiert, daß Einzelzellen erfolgreich untersucht werden konnten. Bei der Optimierung schien die Wahl einer geeigneten Taq.-Polymerase entscheidend zu sein. Das hierbei ausgewählte Enzym *pfu-Turbo-DNA-Polymerase* zeichnet sich neben seiner Leserkorrektur-Aktivität, um die Fehlerrate möglichst gering zu halten, insbesondere durch eine hohe Prozessivität, um während der definierten Extensionszeit viele Kopien generieren zu können, aus. Nach Modifizierung anderer Parameter in der DOP-PCR konnte das genomische Material aus einer einzigen kultivierten Zelle zuverlässig und reproduzierbar vermehrt werden, ohne die DNA zuvor zu extrahieren. Dies setzte eine optimale Zell-Lyse voraus, die durch Einsatz vom Tween 20 als Detergens in Kombination mit Proteinase K erreicht wurde. Dadurch konnte die DNA weitgehend von Kernproteinen befreit werden. Diese Modifikation erhöhte die Effizienz der Präamplifikationsphase. Kürzlich wurde nach der Evaluierung der zuvor existierenden DOP-Protokolle über eine Effizienzrate⁷ von nur 3 % für äquivalente DNA-Menge berichtet

⁵ In anderen Studien wurde für hier eingesetzte Marker von einer Informativitätsrate von über 70 % berichtet. Diese kann allerdings von Population zu Population variieren.

⁶ Diese Technik wird in der Molekularonkologie zunehmend eingesetzt. Eine weitere Entwicklung dieser Methode basiert auf Laser-Steuerung, was eine genauere Präparation des Zellareals ermöglicht.

⁷ Mit der Effizienzrate ist die Summe der amplifizierten Produkten zu den Gesamtreaktionen gemeint, wobei als Template ein Teil der DOP-Reaktion eingesetzt wurde.

(Dietmaier et al. 1999). Im Vergleich ist das von mir entwickelte DOP-Protokoll eine deutliche Verbesserung gegenüber den beschriebener Methoden. Im nächsten Schritt wurde die Methode anhand archivierten Tumormaterials (Formalin-fixiertes und im Paraffin eingebettetes Gewebe) überprüft. Hierbei wurden in der Regel mindestens 40 Zellen benötigt. Im Gegensatz zu Frischzellen variierte die Effizienzrate der DOP-PCR bei dem archivierten Material deutlich. Dies ist vermutlich eine Folge der Gewebe-Fixierung durch Formalin, wobei die DNA-Stänge durch einen oxidativen Vorgang beschädigt werden. Ferner ist es wahrscheinlich, daß aus den präparierten Läsionen nicht immer die gleiche Anzahl an Zellen gewonnen werden konnte, so daß in einigen Fällen zu wenig Zellen in die Reaktion eingesetzt wurden und somit die Erfolgsrate der DOP-PCR reduzierte.

Bei der Durchführung der DOP-PCR wurden stets zwei Reaktionen pro Läsion generiert, d.h. die präparierte Läsion wurde nach dem Lyse-Vorgang in zwei Hälften geteilt und jede Hälfte für eine DOP-PCR verwendet. Bei der LOH-Analyse wurden diese DOP,s als Template verwendet, wobei Pro Mikrosatelliten-Marker und Läsion insgesamt vier PCR,s durchgeführt wurden⁸. Diese Maßnahme sollte helfen, falsch positive LOH,s zu eliminieren. Bei der Auswertung der Daten wurden nur diejenigen als korrekt bewertet, die in beiden DOP-Reaktionen identische Ergebnisse zeigten. Anhand dieser Kontrollreaktionen konnten eine Reihe von nicht reproduzierbaren Reaktionen pro Läsion festgestellt werden, die hier als ‚Artefakte‘ bezeichnet wurden. Es konnte jedoch bei genauerer Betrachtung der Daten gezeigt werden, daß in meisten Fällen die Ergebnisse innerhalb einer DOP-Reaktion übereinstimmend waren (siehe Tabelle 3.3). Die diskordanten Ergebnisse zwischen zwei DOP,s könnten zum einen durch suboptimale Reaktionsbedingungen (z. B. durch geringe Zellzahl in einer der beiden Reaktionen) und zum anderen durch Subpopulation innerhalb der Gangläsionen verursacht sein, was letztendlich zu unterschiedlichen LOH-Ergebnissen in beiden DOP,s führen kann.

Eine weitere Ursache, die die auswertbaren Daten reduzierte, waren die PCR-Ausfälle. 283 PCR-Reaktionen (11 %) ergaben kein Produkt. In einem direkten Vergleich konnte keine Abhängigkeit der Ausfälle mit den eingesetzten Markern sowie deren Längenprodukte festgestellt werden. In einer Studie konnte anhand der DNA-Vedünnungsreihe gezeigt werden, daß die Mikrosatelliten-Marker mit einer CA-Wiederholung bei nicht ausreichenden

⁸ Pro DOP-PCR wurde anhand eines Markers ein Fragment amplifiziert. Als Kontrolle wurde dann dieser Vorgang wiederholt, so daß insgesamt vier Reaktionen durchgeführt worden sind.

DNA-Konzentrationen anfälliger für Ausfälle sind (Foucault et al., 1996). Hier konnte jedoch kein kausaler Zusammenhang zwischen Verwendung dieser Marker und Ausfallsfrequenz festgestellt werden. In einer anderen Arbeit wurde berichtet, daß die Marker zur Generierung der Dinukleotid-Repeats problematischer sind als Marker mit Tri- bzw. Tetranukleotid-Repeats⁹ (Ginot et al. 1996). Dies könnte u.a. ein Grund der Ausfälle bei der LOH-Analyse gewesen sein, da 9 von 13 eingesetzten Marker zur Klasse der Dinukleotidrepeats gehören.

4.5. Die Rolle vom p53-Gen bei der Progression der Gangepithelien

Die LOH-Analyse an histologischen Präparaten zeigten, daß der Chromosomenarm 17p13 in den hyperplastischen Läsionen mit einer papillären Struktur in 17 % der Fälle deletiert war. Dies deutet indirekt darauf hin, daß das p53-Gen in der Nähe dieses Locus bei einer kleinen Population sehr früh inaktiviert sein könnte. Diese interessante Feststellung ist insofern überraschend, da dieses im Darmkrebs später verloren geht und zwar erst in den Läsionen mit hochgradiger Dysplasie (Boland et al., 1995). Diese Tatsache unterstreicht die Divergenz der Tumorarten hinsichtlich genetischer Entwicklungen. In dem darauffolgenden Progressionsstadium mit niedriger Dysplasie (PanIN 2) lag der Wert bei 50 %. Dies bedeutet eine deutliche Steigerung der LOH-Rate dieser Läsionen gegenüber der präneoplastischen mit geringer Dysplasie. Das Produkt vom p53-Gen ist ein multifunktionaler Wachstumsregulator. Daher wäre es nicht überraschend, wenn der Hälfte aller dysplastischen Gangläsionen die vom p53 ausgehende Wachstumskontrolle verloren ginge und somit eine strukturell sichtbare Veränderung der Epithelzellen zu beobachten ist. Aller Wahrscheinlichkeit nach könnte die p53-Inaktivierung zumindest bei einer Untergruppe der Pankreasläsionen eine Rolle bei Transit der hyperplastischen Gangepithelien in die mit einem dysplastischen Charakter spielen. Dies wird bei der Rekapitulierung der zellulären Funktionen vom p53-Gen deutlich: Das Protein ist in proliferativen Zellen nachweisbar, in ruhenden Zellen jedoch nur in geringen Mengen oder gar nicht. Der Anstieg der p53-Konzentration wurde in Zellen mit DNA-Schädigung beobachtet. Tierexperimente konnten zeigen, daß durch Wildtyp-p53 die Zellzyklus-Phase G1¹⁰ solange angehalten wird, bis die Schäden repariert sind (Levine, 1997). Dabei agiert das p53-Genprodukt als Transkriptionsfaktor für bestimmte stromabwärts liegende Gene. Das transkriptionsaktivierende Signal befindet sich am N-Terminus des Proteins (Vogelstein & Kinzler, 1994). Erst durch Bildung eines Tetramers bindet sich das

⁹ Diese Art von Wiederholungen tendiert zur Bildung z-förmiger Sekundärstrukturen, so daß die DNA-Polymerase nicht an die Matrix gelangen kann.

¹⁰In der G1-Phase werden die für DNA-Synthese notwendigen Komponenten vorbereitet.

p53 als aktiver Transkriptionsfaktor an den Promotor des Zielgens (in diesem Fall p21WAF-Gen). Das p21-Produkt inhibiert seinerseits spezifische Kinasen (CyclinE:Cdk2 und CyclinA:Cdk2) in der G1-Phase und unterbindet auf diese Weise die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb) und folglich die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F aus dem inaktiven E2F-pRb-Komplex. Durch antiproliferative Eigenschaften des pRb-Proteins können so wichtige Enzyme für die DNA-Synthese in der S-Phase nicht bereitgestellt werden. Durch Gentyplisierung konnte in dieser Arbeit der Verlust eines Allels (LOH) im p53-Gen bestimmt werden. So stellt sich die Frage, welche Rolle das verbleibene Allel spielt. Nach dem ‚two hit‘ Modell (Knudson, 1971) sind immer zwei aufeinanderfolgende Treffer (Hits) nötig, um eine normale Zelle in eine Tumorzelle zu verwandeln. In diesem Fall kann also angenommen werden, daß das zweite Allel bereits durch Mutation seine Funktion verloren hat. Anders wäre der progressive Effekt vom p53 nicht bemerkbar. Dies wurde auch durch zahlreiche Studien bestätigt (Nigro et al., 1989; Takahashi et al., 1989; Iggo et al., 1990). Scheinbar ist der Zeitpunkt der Inaktivierung vom Tumortyp abhängig, was mit verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren des jeweiligen Gewebes zusammenhängt (Levine, 1997). In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß eine Mutationsbestimmung in den hier untersuchten Tumorsuppressorgenen aufgrund nicht ausreichender DNA-Menge nicht möglich gewesen ist¹¹, so daß der letztendliche Beweis bei der obigen Hypothese noch aussteht.

Bekannterweise besitzt das mutierte p53-Protein eine längere Halbwertszeit als der Wildtyp. Folglich könnte der Nachweis dieses Proteins im Zytoplasma bzw. im Zellkern indirekt auf das mutierte Protein hinweisen. Immunhistochemische Färbungen mittels eines monoklonalen Antikörpers sind zu diesem Zweck effizient und einfach durchführbar. Mit Hilfe dieser Methode wurden auch hier die duktales Pankreasläsionen parallel zu den molekularbiologischen Untersuchungen auf die Expression des p53-Proteins überprüft. Es wurden in 20% der PanIN 2-Läsionen eine Überexpression des p53-Proteins nachgewiesen. In den PanIN 3-Läsionen zeigten 41% der untersuchten Fälle eine positive Reaktion. In 66% der Tumoraläsionen konnte das p53-Protein nachgewiesen werden. Dagegen waren alle hyperplastische Läsionen PanIN 1A und 1B negativ. Ein Vergleich immunhistochemischer Ergebnisse mit den LOH-Daten läßt vermuten, daß Deletionen in diesem Gen viel früher zur Inaktivierung einer Genkopie führen und daß die verbleibende zweite Kopie erst in den fortgeschrittenen Stadien durch Mutation verloren gehen würde. Nach dem Modell vom

¹¹ 80 % der durch DOP-Reaktion generierte DNA wurde für die LOH-Analyse, der Rest für Mutationsanalyse des K-ras-Gens verwendet.

Knudson wird jedoch angenommen, daß Mutationen vor Deletionen zur Inaktivierung eines Suppressorgens beitragen. Es könnten diesbezüglich zwei Gründe als Ursache aufgeführt werden, warum in den hyperplastischen Läsionen trotz nachgewiesenen Deletionen immunhistologisch kein Mutationsnachweis gelang. Sollte die Inaktivierung des TP53-Gens in der Tat in dieser Reihenfolge geschehen, leitet die ‚Haploinsuffizienz‘ eine mögliche Erklärung, so daß eine reduzierte Gendosis verantwortlich für den Wachstumsvorteil einer Zelle ist. In einem Mausmodell wurde gezeigt, daß das Vorhandensein nur eines Wildtypallels des TP53-Gens nicht ausreichend sei, um die transkriptionelle Aktivierung weitere Gene signifikant beibehalten zu können (Gottlieb et al. 1997).

Darüber hinaus könnten durch die LOH-Analyse nachgewiesene Deletionen im 17p13-Locus ein anderes, eng benachbartes Gen als das angenommene p53-Gen betreffen. Diese Hypothese könnte zutreffen, da die untersuchte Region in diesem Locus ca. 4 cM (CentiMorgan)¹² lang ist. Ferner liegen die meisten Deletionen zentromer bzw. telomer zu diesem Gen (siehe Ergebnisse, Abb. 3.5). Hierbei war der eingesetzte Marker (TP53) innerhalb dieses Gens unglücklicherweise oft nicht informativ, so daß eine allelische Deletion nur anhand der flankierten Marker außerhalb der codierenden Sequenz zu bestimmen war.

Wie oft in physiologischen Signalwegen zu beobachten ist, gibt es außer p53 auch andere Faktoren, die den Übergang von G1- in die S-Phase während des Zellzyklus überwachen. Der Übergang von hyperplastischen zu dysplastischen Läsionen kann also nicht allein durch den Funktionsausfall von p53 bedingt sein. Wie schon erwähnt, übernimmt dieses Protein in der Zelle verschiedene Aufgaben. Eine weitere Funktion besteht im Falle einer irreparablen DNA-Schädigung in den programmierten Zelltod (Apoptose). DNA-Strangbrüche durch z.B. ionisierende Strahlen lösen katalytische Aktivitäten bestimmter Enzyme (u a. ATM-Kinase) aus. Dadurch wird das p53-Protein phosphoryliert, was wiederum die Expression der für die Apoptose notwendigen Gene *bax* und *pig* induziert (Canman et al., 1998). Der Verlust von diesem Gen in den zuvor erwähnten Läsionen verschafft scheinbar so einen Proliferationsvorteil jener Zellen, der sich anhand histologischer Veränderungen bemerkbar machte.

4.6. Involvierung der Suppressorgene p16 und DPC4 in der Tumorentwicklung

Die Alleltypisierung für die Gene p16 und DPC4 zeigte abgesehen von einem einzigen LOH-Fall auf 18q intakte Chromosomenarme in den präneoplastischen Läsionen PanIN 1A und 1B.

¹² Dies ist ein Maß für einen genetisch definierten Abstand, der einer einprozentigen Wahrscheinlichkeit für eine Rekombination im Verlauf der Meiose entspricht. Ein CentiMorgan ist im Schnitt ein Megabase (1000 Kb) lang.

Ein paralleler Anstieg der LOH-Rate auf 30 % war für beide Chromosomenarme 9p und 18q in den PanIN2-Läsionen zu verzeichnen. Im nächsten Progressionsstadium PanIN 3 war der LOH-Anstieg der genannten Bereiche auf über 80 % bemerkenswert. Definitionsgemäß unterscheiden sich die histologisch klassifizierten Läsionen PanIN 2 und 3 lediglich in einer mikroskopisch sichtbaren Veränderung des Zellkerns. Angesichts der hier erzielten Daten gibt es offensichtlich eine Korrelation zwischen phänotypischen und genotypischen Veränderungen dieser Läsionen. Möglicherweise bedarf der Übergang von PanIN 2 zu PanIN 3 in den duktalem Epithelzellen dem Funktionsverlust eines der beiden Suppressorgene p16 bzw. DPC4. Welches dieser Gene in der Tumorentwicklung früher betroffen ist, kann anhand der Daten nicht entschieden werden. Hierfür können zwei Gründe verantwortlich gemacht werden: In den untersuchten Proben mag die Anzahl der Läsionstypen nicht genügend hoch gewesen sein, um einen deutlichen Unterschied erkennen zu können, so daß ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den PanIN 2 und 3 nicht zu ermitteln war. Ferner ist es durchaus möglich, daß unterschiedliche genetische Alterationen zu keinen speziellen pathologischen Veränderungen führen und so der Detektion entgehen.

Rozenblum et al. untersuchten kürzlich das Tumormaterial der Bauchspeicheldrüse in 42 Individuen im Hinblick auf genetische Alterierungen und fanden eine hohe Konkordanz in der Inaktivierung der p16- und DPC4-Gene. Dies korrelierte mit den hier erzielten Ergebnissen. Weiter vermuten sie, daß die Inaktivierung vom p16-Gen eine Veränderung im DPC4-Gen begünstigen würde. Demzufolge würde der Funktionsverlust dieses Gens erst in einer späteren Phase für die Tumorentwicklung entscheidend sein.

Die durchgeführte Expressionsanalyse zum Nachweis des DPC4-Proteins erhärtet die obige Vermutung. Anhand eines monoklonalen Antikörpers gegen dieses Protein konnte der Expressionslevel in den Gangläsionen bestimmt werden. Danach zeigten alle untersuchten hyperplastischen Läsionen PanIN1A und 1B eine positive Reaktion. Das bedeutet, daß das Protein in den genannten Läsionen noch exprimiert wird. LOH-Analyse dieser Läsionen innerhalb des DPC4-Locus zeigten bis auf eine Ausnahme keine Deletion. Beide Resultate weisen auf eine intakte Genkopie in beiden Allelen hin. In 13 % der PanIN2-Läsionen konnte kein Protein nachgewiesen werden. 41 % der PanIN3-Läsionen und 50% der Karzinomläsionen zeigten einen Expressionsverlust dieses Gens. Hierbei kann der Expressionsverlust des DPC4-Proteins durch eine homozygote Deletion verursacht sein. Da die untersuchten Läsionstypen in diesem Fall sowohl auf der Genebene als auch der Proteinebene verhältnismäßig ähnliche Ergebnisse zeigen, könnte die Inaktivierung beider Allele dieses Gens die Folge einer Mutation in einer Kopie und Deletion in der anderen sein.

In den histologisch unterschiedlichen Stadien wurde jedoch seltener ein Expressionsverlust nachgewiesen. Dieses Phänomen hat man bereits in den anderen Studien beobachtet. Alleltypisierung des DPC4-Gens zeigte beispielsweise in 91% der Pankreastumoren eine Deletion. Jedoch war dieses Gen nur in 50% der Fälle mutiert (Hahn et al. 1996).

Zu einer weiteren Inaktivierungsform in diesem Gen wird die ‚homozygote Deletion‘ gezählt. Dieser Art von Deletion beschreibt den Verlust beider Allele, konnte jedoch hier nicht sicher erkannt werden, da die Detektion durch kontaminiertes Normalgewebe verdeckt werden kann. Zum anderen bedeutet der Verlust beider Allele das Fehlen eines Amplifikats bei der LOH-Analyse, was den technisch bedingten ‚Ausfällen‘ gleichzusetzen ist. Folglich ist eine eindeutige Aussage über eine homozygote Deletion bei diesen Analysen nicht möglich.

4.7. Onkogene Aktivierung des K-ras-Gens in präneoplastischen Läsionen

Bereits in 23 % der hyperplastischen Läsionen mit einer flachen Struktur (PanIN1A) konnten Punktmutationen im Codon 12 nachgewiesen werden. Bei den darauffolgenden Progressionsstadien wurde nur ein leichter Anstieg der Mutationsrate bis 41 % (PanIN3) beobachtet. In einer weiteren Studie ist eine vergleichbare Mutationsrate bei diesen Läsionen beobachtet worden (Lüttges et al., 1999). In duktalem Läsionen mit einer Zellkernatypie wurde in einer anderen Arbeit in 75 % der Fälle mutiertes Ras gefunden (Moskaluk et al., 1997). Die bisher nachgewiesene Mutationsrate im K-ras-Gen rangiert zwischen 47-100 % (Almoguera et al., 1988; Shibata et al., 1990; Smit et al., 1988). In der vorliegenden Studie waren Mutationen am häufigsten bei Karzinomläsionen (73 %) zu verzeichnen. In einigen Fällen sind unterschiedliche Mutationen im Codon 12 nachgewiesen worden, so daß in diesem Zusammenhang die ‚klonale Entwicklung‘ der Tumorzellen innerhalb einzelner Läsionen erhärtet wird. Bei einem Fall ohne Pankreaskarzinom wurde in einer einzigen Läsion eine Mutation im Codon 12 (Läsion E65/PANin 2 :GGT zu CGT) registriert. In keiner anderen Tumorart ist dieses Onkogen in der Prevalenz (80-100 %) durch Mutationen aktiviert (Grünwald et al., 1989; Nagata et al., 1990; Wayrer et al., 1996). So könnte dieses Gen als ein potentieller Marker in der Diagnose vom Pankreaskrebs gehandelt werden (Almoduera et al., 1988; Barton et al., 1991). Jedoch wurden bei Personen mit chronischer Pankreatitis Ras-Mutationen nachgewiesen (Burns et al., 1993), ohne daß sie später an Krebs erkrankten. Es scheint, daß die Zelle(n) mit Ras-Mutation ohne Inaktivierung eines weiteren Tumorsuppressorgens apoptotisch eliminiert werden, so daß die onkogene Aktivierung allein keinen Wachstumsvorteil bewirken kann (Burns et al., 1993). Darüber hinaus zeigten Hind et

al., daß die onkogene Aktivierung des Ras-Proteins in Kooperation mit der Mutation im p53-Gen die Transformation der betroffenen Zellen zufolge hat.

Wie schon erläutert wurde (siehe Einleitung), stimuliert die durch Mutation verursachende konstitutive Aktivierung dieses Gens die Zellteilung und bei jeder weiteren Teilung (falls alle anderen Kontrollmechanismen versagen) wird es wahrscheinlicher, daß eine zweite Genveränderung hinzukommt. Die Tatsache, daß hier wie in anderen Arbeiten eine häufige Ras-Mutation in allen morphologischen Vorläuferläsionen zu beobachten ist, unterstreicht die neoplastische Natur dieser Läsionen (DiGiuseppe et al., 1995) und deutet auf eine Beteiligung dieses Gens an der Entstehung des Pankreaskrebs hin. Jedoch kann diesem Gen keine Initiator-Rolle zugeschrieben werden (siehe Abschnitt 4.9). Vielmehr dürfte es die Inaktivierung weiterer Gene wahrscheinlicher machen.

4.8. Schrittweise Entstehung des Pankreaskarzinoms

Die erzielten Ergebnisse demonstrieren erstmals, daß die morphologisch erfaßbaren Gangveränderungen in der Nachbarschaft der Karzinomläsionen im Pankreasgewebe klonale chromosomale Veränderungen aufweisen. So können diese Läsionen als Vorläufer bezeichnet werden. Die Entwicklung dieser Vorläuferläsionen bis hin zur Bildung eines malignen Tumors hängt offenbar von der Akkumulation weiteren Genalterierungen ab (siehe Abb.3.8). Angesichts der Mutationsrate im K-ras-Gen tragen die hyperplastischen Läsionen PanIN1A und 1B bereits eine genetische Veränderung. Bezüglich der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zeigen je 40 % der PanIN2-Läsionen einen bzw. zwei Treffer (Hits). In den PanIN3-Läsionen sind in 61 % der Fälle zwei und in weiteren 26 % schon drei Treffer zu verzeichnen. Die höchste Anzahl der ‚Hits‘ befinden sich mit über 70 % in Karzinomläsionen. Eine Deregulierung der Zellteilungsmechanismen durch den Verlust suppressiver Eigenschaften von p53, p16 und DPC4 können demzufolge für die Entstehung des Krebs im Pankreasgewebe verantwortlich gemacht werden. Eine konstitutiv onkogene Aktivierung kann dabei durch Erhöhung der Mutationsrate diesen Prozeß beschleunigen. Interessanterweise steigt die Anzahl der genetischen Alterationen proportional mit den histologischen Stadien.

Neben dem akkumulativen Effekt dieser Geninaktivierungen spielt möglicherweise die zeitliche Abfolge dieser Ereignisse eine wichtige Rolle (Vogelstein et al., 1988). Diesbezüglich findet zunächst eine Deletion im 17p13-Locus in einem kleinen Teil der PanIN1B-Läsionen statt. Diese LOH-Rate weist im nächsten Stadium PanIN 2 eine dreifache Steigerung auf. Ebenso wurde ein paralleler Anstieg der chromosomalen Stückverluste in den

Loci 9p21 bzw. 18q21.1 in den PanIN2-Läsionen registriert, der jedoch in geringerer Frequenz als bei der 17p13-Region nachweisbar war. Eine deutliche Zunahme der chromosomalen Allelverluste zeigten diese beide Gen-Loci erst in den PanIN 3-Läsionen.

Anbetracht dieser Kenntnisse kann für die Tumorigenese der Bauchspeicheldrüse folgendes Modell vorgeschlagen werden (siehe Abb. 4.1). Mutationen im Ras-Gen sind ein frühes Ereignis. Dies könnte den Verlust eines Allels im p53-Gen in den papillär hyperplastischen Läsionen begünstigen. Wie schon erwähnt, gibt es einige Hinweise darauf, daß die p16-Geninaktivierung wahrscheinlich vor einer DPC4-Alterierung geschieht. Demzufolge kann spekuliert werden, daß die Inaktivierung beider Gene p16 und p53 der treibende Faktor für den Transit der neoplastischen Zellen in das nächste Progressionsstadium PanIN 2 ist. Eine Ansammlung dieser Veränderungen würde dann durch einen additiven Funktionsverlust vom DPC4-Gen in den PanIN3-Läsionen verstärkt werden, was letztendlich zur Entwicklung maligner Zellen (des Karzinoms) führt.

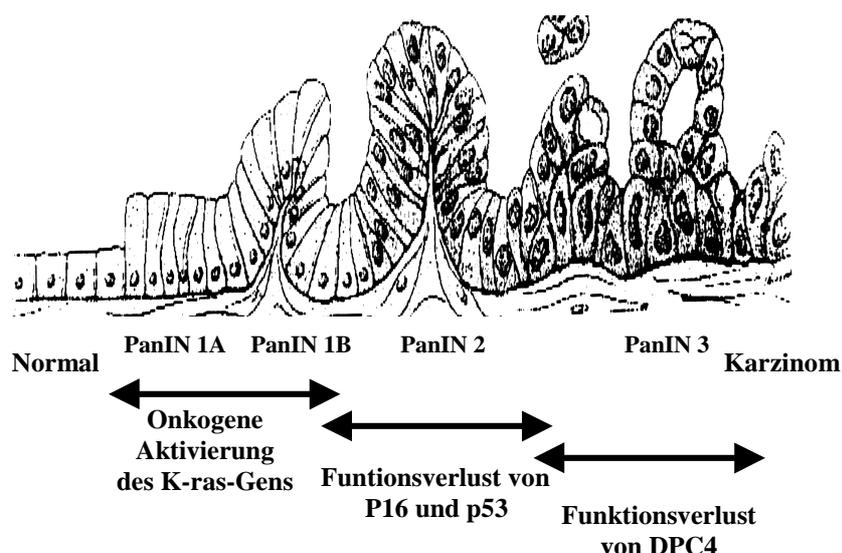


Abb. 4.1: Ein hypothetisches Modell: Die Entwicklung eines Tumors in der Bauchspeicheldrüse beginnt mit einer Genveränderung innerhalb einer normalen Zellpopulation, durch die ein Wachstumsvorteil generiert wird. Folglich entstehen hyperplastische Läsionen, wobei das Vorkommen weiterer Genalterierungen wahrscheinlicher wird. Die Akkumulation dieser Ereignisse bewirken die Weiterentwicklung dieser Läsionen zu jener mit dysplastischem Charakter bis hin zum Krebs.

4.9. Weitere Kenntnisse aus der Pankreas-Forschung

Abgesehen von den hier untersuchten Gen-Loci werden zur Zeit eine Reihe von weiteren putativen Suppressorgenen debattiert, die möglicherweise in der Tumorphysion des Pankreas eine Rolle spielen können. Die LOH-Analyse von Pankreastumoren zeigte überraschend in 70 % bzw. 80 % einen Allelverlust auf dem Chromosomenarm 1p und 7p. Durch weitere Studien konnte zudem eine Überamplifizierung des *c-myc*-Onkogens im Locus 6q24 identifiziert werden (Achille et al., 1996; Hahn et al., 1995; Seymour et al., 1994; Wallrapp et al., 1997). Ferner zeigen Patienten mit einem Peutz-Jeghers-Syndrom¹³ ein erhöhtes Risiko für Pankreaskrebs (Giardiello et al., 1987). Auf dem Chromosomenarm 19p wurde später das für diese Erkrankung verantwortliche Gen lokalisiert (Hemminki et al., 1997). Kürzlich wurde die Beteiligung des Tumorsuppressorgens BRCA2 auf dem Chromosom 13q12 an der Entstehung des Mammakarzinoms demonstriert (Collins et al., 1995). Keimbahnmutationen in diesem Gen wurden auch bei sporadischen Pankreaskarzinomen nachgewiesen (Goggins et al., 1996). Ferner wurde festgestellt, daß Patienten mit Mammakarzinom eine Präferenz für Pankreaskrebs zeigen (Teng et al., 1996).

In diversen Studien konnte gezeigt werden, daß die Überexpression einer Reihe von Wachstumsfaktoren an der progressiven Malignität der Pankreastumoren beteiligt sind.

EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor-receptor*) ist beispielsweise ein transmembranes Protein mit einer Tyrosin-Kinase-Aktivität, der an den Zelldifferenzierungsprozessen beteiligt ist (Wiley et al., 1995). In 12-46 % der Pankreastumoren ist dieses Protein überexprimiert (Yamanaka et al., 1993). Im Zusammenhang der Metastasierung wurde auch über die Involvierung des für die Angiogenese zuständigen VEGF (*vascular endothelial growth factor*) berichtet (Itakura et al., 1997). Durch Bereitstellung dieses Proteins wird eine Neubildung der Blutgefäße induziert (Ferrara et al., 1992).

4.10. Zukunftsperspektive

Eines der Hauptziele in der Krebsforschung ist die Entwicklung eines genetischen Profils für die jeweiligen Tumorarten. Daher strebte auch die vorliegende Studie an, solche Merkmale zu charakterisieren, die bei der Krebsentstehung der Bauchspeicheldrüse verantwortlich zu sein scheinen. Diese Kenntnisse können so in der Früherkennung der Erkrankung von Bedeutung sein. Zum Zeitpunkt der klinischen Diagnose ist der Pankreastumor oft bereits metastasiert. Tumoren mit einem Durchmesser von einem Zentimeter befinden sich aus pathologischer

¹³ Das Charakteristikum dieser Erkrankung ist die Bildung von Pigmentflecken auf den Lippen sowie die Erscheinung von Polypen im Gastrointestinaltrakt.

Sicht im Anfangsstadium, sind biologisch jedoch eher fortgeschritten (*national cancer institute*). Im Hinblick auf die aggressiven Wachstumseigenschaften und den oft symptomarmen Verlauf der Pankreastumorerkrankung ist es zwingend notwendig, die molekularbiologisch bekannten Parameter stärker in der Diagnose einzusetzen, um so eine bessere Prognose zu ermöglichen. Richtungsweisend hat man die Detektion der K-ras-Mutation (aufgrund seiner hohen Prävalenz in den Pankreastumoren) in den Stuhlproben sowie Pankreassekreten der Risikopersonen als diagnostisches Mittel durchgeführt (Caldas et al., 1994; Tada et al., 1993). Wie bereits im Abschnitt 4.7. erwähnt wurde, werden Mutationen in diesem Gen nicht selten in den Gangläsionen gesunder Personen beobachtet, so daß dieser ‚Gen-Test‘ allein keine zuverlässige Unterscheidung zwischen Identifikation von Risikopersonen zuläßt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, daß ein Allelverlust auf dem chromosomalen Arm 17p13 im Bereich des p53-Gens in einem frühen Stadium geschieht. In Anbetracht dieser neuen Kenntnis würde der Nachweis dieses veränderten Gens in den Patientenproben auf die Gefahr einer Tumorentwicklung in einer absehbaren Zeit hinweisen. Derzeit ist der Nachweis dieser Veränderungen an gängigen Proben wie z. B. Blut und Pankreassekreten leider noch mit erheblichen technischen Schwierigkeiten verbunden. Eine Weiterentwicklung der Nachweismethoden wird in der Zukunft die Analysen vereinfachen und beschleunigen.

Derzeit werden einige therapeutische Maßnahmen wie beispielsweise der Einsatz eines Farnesyltransferase-Hemmer¹⁴ zur Blockierung des mutierten Ras-Proteins überprüft, ob dadurch der weitere Verlauf einer Tumorentwicklung verhindert werden kann (Tamanoi, 1993). Weitere gentherapeutische Versuche zeigen in Tiermodellen beachtliche Erfolge (Colomer et al., 1994; Barton et al., 1995; Cai et al., 1995; Porter et al., 1996), sind in der Praxis jedoch wenig effizient. Eine Weiterentwicklung dieser Versuche dürfte in der Zukunft vielversprechend sein, was die Heilungschancen bei den Krebspatienten entscheidend verbessern könnte.

¹⁴ Für die transformierende Wirkung von RAS-Proteinen ist deren Assoziation mit der Zellmembran von essentieller Bedeutung. Dies geschieht durch eine kovalente Bindung eines Farnesylrests mit dem Cysteinrest mittels einer Farnesyltransferase.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde es durch die Optimierung der DOP-Technik erstmals möglich, den histomorphologisch unterscheidbaren dukta len Pankreasläsionen genetische Befunde gegenüberzustellen. Hierbei wurden chromosomale Deletionen auf dem Chromosomenarm 17p13.1, 9p21 und 18q21.1 mittels der LOH-Analyse sowie die onkogene Aktivierung des K-ras-Gens durch die Punktmutationsanalyse bestimmt. Parallel zu den DNA-Analysen wurde durch Einsatz monoklonaler Antikörper gegen das DPC4-Wildtyp-Protein sowie das p53-Protein eine Expressionsanalyse angefertigt.

Durch den Einsatz der Mikrodissektion-Technik und der anschließenden Genom-Vermehrung konnte eine genaue Analyse der Gangläsionen durchgeführt werden. Im Hinblick auf ihre morphologischen Progressionsstadien demonstrieren hier molekulargenetische Untersuchungen der Gangläsionen eine zunehmende Genalterierung in den drei Suppressorgenen sowie im K-ras-Gen. Die Veränderung dieser Gene wurde bislang ausschließlich in den Pankreastumoren und vereinzelt in den präneoplastischen Läsionen gezeigt. Jedoch existierte keine detaillierte Studie, in der alle Entwicklungsstadien berücksichtigt wurden. Die erzielten Ergebnisse zeigen, daß phänotypisch faßbare Eigenschaften der Gangläsionen mit der Veränderung des Erbmaterials korreliert und die Gangepithelzellen die Tumor-Vorläufer darstellen.

Ferner kann vermutet werden, daß die Inaktivierung vom p53-Gen für den Transit der hyperplastischen Läsionen in die mit Dysplasie notwendig ist. Immunfärbungen dieses Genprodukts zeigten jedoch eine Akkumulation dieses Proteins erst in PanIN3-Läsionen, was im allgemeinen als Hinweis einer Mutation in diesem Gen gesehen wird. Als Grund, warum hierbei Deletionen vor Mutationen auftreten, wurde die Dosisempfindlichkeit dieses Gens diskutiert, so daß in diesem Gen eine der beiden Kopien durch Deletion eliminiert ist und das scheinbar zweite Wildtyp-Allel aufgrund einer Haploinsuffizienz den notwendigen Funktionslevel nicht aufrechterhalten könnte.

Eine merkbare Zunahme der chromosomalen Allelverlust-Rate zeigten die Loci 9p21 und 18q21.1 erst in den PANin 3-Läsionen, die statistisch in gleicher Frequenz erfaßt wurde. So dürfte die Inaktivierung der Gene p16 und DPC4 innerhalb dieser Regionen für die Progression der Gangläsionen in die hochgradig dysplastischen Epithelzellen entscheidend sein. Expressionsanalysen zum Nachweis des DPC4-Protein zeigten, daß ein signifikanter Expressionsverlust ab PanIN3-Läsionen auftritt.

Anhand der Ergebnisse wurde ein hypothetisches Modell für die Pankreasprogression vorgeschlagen. Dabei wurden die Frequenz und die zeitliche Abfolge der in der vorliegenden Arbeit gefundenen genetischen Ereignisse berücksichtigt. Danach geschieht die p53-Genaktivierung in einem kleinen Teil der hyperplastischen Läsionen, was möglicherweise durch onkogene Aktivierung vom K-ras-Gen beschleunigt wird. Ein Funktionsverlust der beiden Tumorsuppressorgenen p16 und DPC4 ereignet sich erst in den dyplastischen Progressionsstadien.

Die Entstehung eines malignen Karzinoms wird scheinbar durch die Akkumulation all dieser Veränderungen bestimmt. Die hier festgestellten Veränderungen sind sicherlich nicht die einzigen, die in der Entstehung des Pankreaskrebses involviert sind. Sie erlauben lediglich die tumorbiologische Rolle von Suppressorgenen in diesem komplexen System besser verstehen zu können.

6. LITERATUR

- Aas, T.; Borresen, A.-L.; Geisler, S.; Smith-Sorenson, B.; Johnsen, H.; Varhaug, J. E.; Akslen, L. A.; Lonning, P. E. : Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nature Med.* 2: 811-814, 1996.
- Achille A, Biasi MO, Zamboni G, Bogina G, Magalini AR, Pederzoli P, Perucho M, Scarpa A: Chromosome 7q allelic losses in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1996 Aug 15 56:16 3808-13
- Aguilar, F.; Harris, C. C.; Sun, T.; Hollstein, M.; Cerutti, P. : Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science* 264: 1317-1319, 1994.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Rarr, M. and Watson, J. D. : *Molecular Biology of the Cell*, 3. Edition.
- Almoguera, C.; Shibata, D.; Forrester, K.; Martin, J.; Arnheim, N.; Perucho, M. : Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53: 549-554, 1988.
- Ara, S.; Lee, P. S. Y.; Hansen, M. F.; Saya, H. : Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 4961, 1990.
- Aubele M, Zitzelsberger H, Schenck U, Walch A, Hofler H, Werner M ,Baker, S. J.; Fearon, E. R.; Nigro, J. M.; Hamilton, S. R.; Preisinger, A. C.; Jessup, J. M.; vanTuinen, P.; Ledbetter, D. H.; Barker, D. F.; Nakamura, Y.; White, R.; Vogelstein, B. : Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221, 1989.
- Banke MG, Aston CE, McNamara PJ, Crwoley KE, Mulvihill JJ, the Family Study of Pancreatic Cancer group. Segregation analysis of pancreatic cancer. *Genet. Epidemiol.* 14: 519, Abstract 6 (1997)
- Barbacid M. : ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827. Review.
- Barbacid M. : ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur J Clin Invest.* 1990 Jun;20(3):225-35. Review. No abstract available.
- Barton CM, Hall PA, Hughes CM, Gullick WJ, Lemoine NR: Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer.
- Barton CM, Staddon SL, Hughes CM, Hall PA, O'Sullivan C, Kloppel G, Theis B, Russell RC, Neoptolemos J, Williamson RC: Abnormalities of the p53 tumour suppressor gene in human pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 1991 Dec;64(6):1076-82.

-
- Bartsch D, Goodfellow PJ, Whelan AJ. :A new familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma associated with mutation in CDKN2. *Am. J. Hum. Genet.* 57 Supplement: A24 (1995)
 - Bartsch D, Rothmund M. :Das familiäre exokrine Pankreaskarzinom. *Deutsch. med. Wschr.* 122: 378-382 (1997)
 - Bartsch D, Shevlin DW, Callery MP, Norton JA, Wells SA Jr, Goodfellow PJ. :Reduced survival in patients with pancreatic adenocarcinoma associated with CDKN2 mutation. *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 680-682 (1996)
 - Bartsch D, Shevlin DW, Tung WS, Kisker O, Wells Jr SA and Goodfellow PJ, (1995). *Genes Chromosom. Cancer*, 14,189-195.
 - Benchimol, S.; Lamb, P.; Crawford, L. V.; Sheer, D.; Shows, T. B.; Bruns, G. A. P.; Peacock, J. : Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat. Cell Molec. Genet.* 11: 505-509, 1985.
 - Beroud, C.; Verdier, F.; Soussi, T. : p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res.* 24: 147-150, 1996.
 - Berton MT, Linehan LA. : IL-4 activates a latent DNA-binding factor that binds a shared IFN-gamma and IL-4 response element present in the germ-line gamma 1 Ig promoter. *J Immunol.* 1995 May 1;154(9):4513-25.
 - *BioTechniques* 23:890-892;1997
 - Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. : Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature.* 1997 Nov 27;390(6658):404-7.
 - Boland CR, Sato J, Appelman HD, Bresalier RS, Feinberg AP. : Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nat Med.* 1995 Sep;1(9):902-9.
 - Borg, A.; Johansson, U.; Johannsson, O.; Hakansson, S.; Westerdahl, J.; Masback, A.; Olsson, H.; Ingvar, C. : Novel germline p16 mutation in familial malignant melanoma in southern Sweden. *Cancer Res.* 56: 2497-2500, 1996.
 - Boring, C. C.; Squires, T. S.; Tong, T. : Cancer statistics, 1993. *CA Cancer J. Clin.* 43: 7-26, 1993.
 - Borresen, A.-L.; Hovig, E.; Smith-Sorensen, B.; Malkin, D.; Lystad, S.; Andersen, T. I.; Nesland, J. M.; Isselbacher, K. J.; Friend, S. H. : Constant denaturant gel electrophoresis as a rapid screening technique for p53 mutations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 8405-8409, 1991.

-
- Bos, J. L.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Verlaan-de Vries, M.; van Boom, J. H.; van der Eb, A. J.; Vogelstein, B. : Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* :1997
 - Brat DJ, Hahn SA, Griffin CA, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. : The structural basis of molecular genetic deletions. An integration of classical cytogenetic and molecular analyses in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 1997 Feb;150(2):383-91.
 - Brennan, J. A.; Boyle, J. O.; Koch, W. M.; Goodman, S. N.; Hruban, R. H.; Eby, Y. J.; Couch, M. J.; Forastiere, A. A.; Sidransky, D. : Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New Eng. J. Med.* 332: 712-717, 1995.
 - Bunz, F.; Dutriaux, A.; Lengauer, C.; Waldman, T.; Zhou, S.; Brown, J. P.; Sedivy, J. M.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. : Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282: 1497-1501, 1998.
 - Burns J., Barton C., Wynford T. D., Lemione N.: in vitro transformation of epithelial cells by ras oncogenes. *Epithelial Cell Biol* (1993), 2:26-43.
 - Caelles, C.; Helmberg, A.; Karin, M. : p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370: 220-223, 1994.
 - Cai DW, Mukhopadhyay T, Roth JA: Suppression of lung cancer cell growth by ribozyme-mediated modification of p53 pre-mRNA. *Cancer Gene Ther.* 1995 Sep;2(3):199-205.
 - Cairns, J.; Mao, L.; Merlo, A.; Lee, D. J.; Schwab, D.; Eby, Y.; Tokino, K.; van der Riet, P.; Blaugrund, J. E.; Sidransky, D. : Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science (Letter)* 265: 415-417, 1994.
 - Cairns, P.; Polascik, T. J.; Eby, Y.; Tokino, K.; Califano, J.; Merlo, A.; Mao, L.; Herath, J.; Jenkins, R.; Westra, W.; Rutter, J. L.; Buckler, A.; Gabrielson, E.; Tockman, M.; Cho, K. R.; Hedrick, L.; Bova, G. S.; Isaacs, W.; Koch, W.; Schwab, D.; Sidransky, D. : Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nature Genet.* 11: 210-212, 1995.
 - Caldas, C.; Hahn, S. A.; da Costa, L. T.; Redston, M. S.; Schutte, M.; Seymour, A. B.; Weinstein, C. L.; Hruban, R. H.; Yeo, C. J.; Kern, S. E. : Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature Genet.* 8: 27-32, 1994.

-
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998 Sep 11 281:5383-1677-9
 - Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, Perucho M. : Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect.* 1991 Jun;93:125-31.
 - Carrere, N.; Leblanc, R. M.; Begueret, J.; Blouin, P.; Cheyrou, A. : A new mutation of exon 5 of the P53 gene in breast cancer. *Hum. Molec. Genet.* 2: 1075, 1993.
 - Casas, E., Kirkpatrick, B.W. (1996) *Biotechniques* 20(2):219-25.
 - Casey, G.; Yamanaka, Y.; Freiss, H.; Kobrin, M. S.; Lopez, M. E.; Buchler, M.; Beger, H. G.; Korc, M. : p53 mutations are common in pancreatic cancer and are absent in chronic pancreatitis. *Cancer Lett.* 69: 151-160, 1993.
 - Chen, L.-C.; Neubauer, A.; Kurisu, W.; Waldman, F. M.; Ljung, B.-M.; Goodson, W., III; Goldman, E. S.; Moore, D., II; Balazs, M.; Liu, E.; Mayall, B. H.; Smith, H. S. : Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 17 is associated with high proliferative capacity and DNA aneuploidy in primary human breast cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 3847-3851, 1991.
 - Chen, P.-L.; Chen, Y.; Bookstein, R.; Lee, W.-H. : Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250: 1576-1580, 1990.
 - Cheung VG, Nelson SF: Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14676-9.
 - Chiao PJ, Hunt KK, Grau AM, Abramian A, Fleming J, Zhang W, Breslin T, Abbruzzese JL, Evans DB: Tumor suppressor gene Smad4/DPC4, its downstream target genes, and regulation of cell cycle. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30;880:31-7.
 - Ciotti P, Stringini P, Bianchi-Scarra G: Familial melanoma and pancreatic cancer. *New Engl. J. Med.* 334: 469-470 (1996)
 - Cline, J., Braman, J., and Kretz, K.(1996) *Nucleic acid Res.* 24:3546-3551.
 - Colomer R, Lupu R, Bacus SS, Gelmann EP. : erbB-2 antisense oligonucleotides inhibit the proliferation of breast carcinoma cells with erbB-2 oncogene amplification. *Br J Cancer.* 1994 Nov;70(5):819-25.
 - Comfort MW, Steinberg AG. :Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 21: 54-63 (1952)

-
- Cooper, D. N.; Youssoufian, H. : The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum. Genet.* 78: 151-155, 1988.
 - Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. : Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem.* 1984 Feb;32(2):219-29.
 - Cornforth, M. N.; Bedford, J. S. : On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia. *Science* 227: 1589-1591, 1985.
 - Cortez, D.; Wang, Y.; Qin, J.; Elledge, S. J. : Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286: 1162-1166, 1999.
 - Cowan, J. M.; Halaban, R.; Francke, U. : Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. *J. Nat. Cancer Inst.* 80: 1159-1164, 1988.
 - Crook, T.; Wrede, D.; Tidy, J. A.; Mason, W. P.; Evans, D. J.; Vousden, K. H. : Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. *Lancet* 339: 1070-1073, 1992.
 - Cubilla AL, Fitzgerald PJ. : Cancer of the exocrine pancreas: the pathologic aspects. *CA Cancer J Clin.* 1985 Jan-Feb;35(1):2-18.
 - Cubilla AL, Fitzgerald PJ. : Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Res.* 1976 Jul;36(7 PT 2):2690-8.
 - David KL, Steiner-Grossman P. :The potential use of tumor registry data in the recognition and prevention of hereditary and familial cancer. *N.Y. State J. Med.* 91: 150-152 (1991)
 - Deng H, Wang W, Xia J: [A technique of constructing human chromosomal band-specific probe pools using degenerate oligonucleotide primer].
 - Derynck, R.; Gelbart, W. M.; Harland, R. M.; Heldin, C.-H.; Kern, S. E.; Massague, J.; Melton, D. A.; Mlodzik, M.; Padgett, R. W.; Roberts, A. B.; Smith, J.; Thomsen, G. H.; Vogelstein, B.; Wang, X.-F. : Nomenclature: vertebrate mediators of TGF-beta family signals. (Letter) *Cell* 87: 173 only, 1996.
 - Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmoller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstadter F, Ruschoff J. : Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol.* 1999 Jan;154(1):83-95.

-
- DiGiuseppe JA, Hruban RH, Goodman SN, Polak M, van den Berg FM, Allison DC, Cameron JL, Offerhaus GJ. : Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol.* 1994 Jun;101(6):684-8.
 - Donhuijsen K.: Histologisches Malignitätsgrading. *Deutsches Ärzteblatt* 95, 1998.
 - Dracopoli, N. C.; Fountain, J. W. : CDKN2 mutations in melanoma. *Cancer Surv.* 26: 115-132, 1996.
 - Durbec JP, Chevilotte C, Bidart JM. Diet, alcohol, tobacco and risk of cancer of the pancreas: a case-control study. *Br. J. Cancer* 43: 463-470 (1983)
 - Ehrental, D.; Haeger, L.; Griffin, T.; Compton, C. : Familial pancreatic adenocarcinoma in three generations: a case report and a review of the literature. *Cancer* 59: 1661-1664, 1987.
 - El-Deiry, W. S.; Kern, S. E.; Pietenpol, J. A.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. : Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genet.* 1: 45-49, 1992.
 - El-Deiry, W. S.; Tokino, T.; Velculescu, V. E.; Levy, D. B.; Parsons, R.; Trent, J. M.; Lin, D.; Mercer, E.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. : WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825, 1993.
 - Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA.: Laser capture microdissection. *Science.* 1996 Nov 8;274(5289):998-1001.
 - Engelen JJ, Albrechts JC, Hamers GJ, Geraedts JP: A simple and efficient method for microdissection and microFISH. *J Med Genet.* 1998 Apr;35(4):265-8.
 - Engelen JJ, Loots WJ, Albrechts JC, Plomp AS, van der Meer SB, Vles JS, Hamers GJ, Geraedts JP. : Characterization of a de novo unbalanced translocation t(14q18q) using microdissection and fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet.* 1998 Feb 3;75(4):409-13.
 - Engelen JJ, Loots WJ, Motosh PC, Moog U, Hamers GJ, Geraedts JP. : Marker chromosome identification by micro-FISH. *Clin Genet.* 1996 May;49(5):242-8.
 - Eskelinen M, Lipponen P. : A review of prognostic factors in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Detect Prev.* 1992;16(5-6):287-95. Review.
 - Evans, J. P.; Burke, W.; Chen, R.; Bennett, R. L.; Schmidt, R. A.; Patchen Dellinger, E.; Kimmey, M.; Crispin, D.; Brentnall, T. A.; Byrd, D. R. : Familial pancreatic adenocarcinoma: association with diabetes and early molecular diagnosis. *J. Med. Genet.* 32: 330-335, 1995.

-
- Falk RT, Pickle LW, Fontham ET, Correa P, Fraumeni JF. Life-style risk factors for pancreatic cancer in Louisiana: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 128: 324-336 (1988)
 - Farmer, G.; Bargonetti, J.; Zhu, H.; Friedman, P.; Prywes, R.; Prives, C. : Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* 358: 83-86, 1992.
 - Faulkner, S.W. and D.A. Leigh : *Biotechniques* (1998) 24:47-50.
 - Fearon, E. R.; Vogelstein, B. : A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.
 - Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. : Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev.* 1992 Feb;13(1):18-32.
 - Fields, S.; Jang, S. K. : Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249: 1046-1049, 1990.
 - FitzGerald, M. G.; Harkin, D. P.; Silva-Arrieta, S.; MacDonald, D. J.; Lucchina, L. C.; Unsal, H.; O'Neil, E.; Koh, J.; Finkelstein, D. M.; Isselbacher, K. J.; Sober, A. J.; Haber, D. A. : Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 8541-8545, 1996.
 - Foucault F, Praz F, Jaulin C, Amor-Gueret M. : Experimental limits of PCR analysis of (CA)_n repeat alterations. *Trends Genet.* 1996 Nov;12(11):450-2.
 - Fountain, J. W.; Karayiorgou, M.; Ernstoff, M. S.; Kirkwood, J. M.; Vlock, D. R.; Titus-Ernstoff, L.; Bouchard, B.; Vijayasaradhi, S.; Houghton, A. N.; Lahti, J.; Kidd, V. J.; Housman, D. E.; Dracopoli, N. C. : Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 10557-10561, 1992.
 - Franklin, W. A.; Gazdar, A. F.; Haney, J.; Wistuba, I. I.; La Rosa, F. G.; Kennedy, T.; Ritchey, D. M.; Miller, Y. : Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium: a novel mechanism for field carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 100: 2133-2137, 1997.
 - Frebourg, T.; Kassel, J.; Lam, K. T.; Gryka, M. A.; Barbier, N.; Andersen, T. I.; Borresen, A.-L.; Friend, S. H. : Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 6413-6417, 1992.
 - Friedl, W.; Kruse, R.; Uhlhaas, S.; Stolte, M.; Schartmann, B.; Keller, K. M.; Jungck, M.; Stern, M.; Loff, S.; Back, W.; Propping, P.; Jenne, D. E. : Frequent 4-bp deletion in exon 9 of the SMAD4/MADH4 gene in familial juvenile polyposis patients. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 403-406, 1999.

-
- Fu, Y. H (1991), *Cell* 67, 1047-58.
 - Fuchs, S. Y.; Adler, V.; Buschmann, T.; Yin, Z.; Wu, X.; Jones, S. N.; Ronai, Z. : JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.* 12: 2658-2663, 1998.
 - Fujii H, Egami H, Chaney W, Pour P, Pelling J. : Pancreatic ductal adenocarcinomas induced in Syrian hamsters by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine contain a c-Ki-ras oncogene with a point-mutated codon 12. *Mol Carcinog.* 1990;3(5):296-301.
 - Fukasawa, K.; Choi, T.; Kuriyama, R.; Rulong, S.; Vande Woude, G. F. : Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271: 1744-1747, 1996.
 - Ghadirian P, Simard A., Baillargeon J. :Tobacco, alcohol, and coffee and cancer of the pancreas. *Cancer* 67: 2664-2670 (1991)
 - Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJ, Gittelsohn AM, Booker SV, Krush AJ, Yardley JH, Luk GD. : Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med.* 1987 Jun 11;316(24):1511-4.
 - Ginot F, Bordelais I, Nguyen S, Gyapay G: Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. *Nucleic Acids Res.* 1996 Feb 1;24(3):540-1.
 - Goggins M., Schutte M, Lu J, Moskakluk CA, Weinstein CL, Petersen GM, Yeo CJ, Jackson CE, Lynch HT, Hruban RH, Kern SE. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 56: 5360-5364 (1996)
 - Goldammer T, Weikard R, Brunner RM, Schwerin M. : Generation of chromosome fragment specific bovine DNA sequences by microdissection and DOP-PCR. *Mamm Genome.* 1996 Apr;7(4):291-6.
 - Goldstein, A. M.; Fraser, M. C.; Struewing J. P.; Hussussian, C. J.; Ranade, K.; Zametkin, D. P.; Fontaine, L. S.; Organic, S. M.; Dracopoli, N. C.; Clark, W. H., Jr.; Tucker, M. A. : Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16 (INK4) mutations. *New Eng. J. Med.* 333: 970-974, 1995.
 - Griffin DK, Sanoudou D, Adamski E, McGiffert C, O'Brien P, Wienberg J, Ferguson-Smith MA. : Chromosome specific comparative genome hybridisation for determining the origin of intrachromosomal duplications. *J Med Genet.* 1998 Jan;35(1):37-41.
 - Grimm DR, Goldman T, Holley-Shanks R, Buoen L, Mendiola J, Schook LB, Louis C, Rohrer GA, Lunney JK. : Mapping of microsatellite markers developed from a flow-sorted swine chromosome 6 library. *Mamm Genome.* 1997 Mar;8(3):193-9.

-
- Gruis, N. A.; van der Velden, P. A.; Sandkuijl, L. A.; Prins, D. E.; Weaver-Feldhaus, J.; Kamb, A.; Bergman, W.; Frants, R. R. : Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nature Genet.* 10: 351-353, 1995.
 - Grunewald K, Lyons J, Frohlich A, Feichtinger H, Weger RA, Schwab G, Janssen JW, Bartram CR. : High frequency of Ki-ras codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. *Int J Cancer.* 1989 Jun 15;43(6):1037-41.
 - Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM. : Diabetes and the risk of pancreatic cancer. Italian Pancreatic Cancer Study Group. *N Engl J Med.* 1994 Jul 14;331(2):81-4.
 - Guran, S.; Tunca, Y.; Imirzalioglu, N. : Hereditary TP53 codon 292 and somatic P16(INK4A) codon 94 mutations in a Li-Fraumeni syndrome family. *Cancer Genet. Cytogenet.* 113: 145-151, 1999.
 - Gyllensten UB. : PCR and DNA sequencing. *Biotechniques.* 1989 Jul-Aug;7(7):700-8.
 - Hahn SA, Seymour AB, Hoque AT, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Allelotype of pancreatic carcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res.* 55: 4670-4675 (1995)
 - Hahn, S. A.; Schutte, M.; Hoque, T. M. S.; Moskaluk, C. A.; da Costa, L. T.; Rozenblum, E.; Weinstein, C. L.; Fischer, A.; Yeo, C. J.; Hruban, R. H.; Kern, S. E. : DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-354, 1996.
 - Halevy, O.; Michalovitz, D.; Oren, M. : Different tumor-derived p53 mutants exhibit distinct biological activities. *Science* 250: 113-116, 1990.
 - Harland, M.; Meloni, R.; Gruis, N.; Pinney, E.; Brookes, S.; Spurr, N. K.; Frischauf, A.-M.; Bataille, V.; Peters, G.; Cuzick, J.; Selby, P.; Bishop, D. T.; Bishop, J. N. : Germline mutations of the CDKN2 gene in UK melanoma families. *Hum. Molec. Genet.* 6: 2061-2067, 1997.
 - Harlow, E.; Williamson, N. M.; Ralston, R.; Helfman, D. M.; Adams, T. E. : Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Molec. Cell. Biol.* 5: 1601-1610, 1985.
 - Harper, J. W.; Adami, G. R.; Wei, N.; Keyomarsi, K.; Elledge, S. J. : The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816, 1993.
 - Hemminki A, Tomlinson I, Markie D, Jarvinen H, Sistonen P, Bjorkqvist AM, Knuutila S, Salovaara R, Bodmer W, Shibata D, de la Chapelle A, Aaltonen LA. : Localization of a

susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nat Genet.* 1997 Jan;15(1):87-90.

- Hinds P, Finlay C, Levine AJ. :Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol.* 1989 Feb;63(2):739-46.
- Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C. C. : p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53, 1991.
- Horsley SW, Knight SJ, Nixon J, Huson S, Fitchett M, Boone RA, Hilton-Jones D, Flint J, Kearney L. : Del(18p) shown to be a cryptic translocation using a multiprobe FISH assay for subtelomeric chromosome rearrangements. *J Med Genet.* 1998 Sep;35(9):722-6.
- Houlston, R.; Bevan, S.; Williams, A.; Young, J.; Dunlop, M.; Rozen, P.; Eng, C.; Markie, D.; Woodford-Richens, K.; Rodriguez-Bigas, M. A.; Leggett, B.; Neale, K.; Phillips, R.; Sheridan, E.; Hodgson, S.; Iwama, T.; Eccles, D.; Bodmer, W.; Tomlinson, I. : Mutations in DPC4 (SMAD4) cause juvenile polyposis syndrome, but only account for a minority of cases. *Hum. Molec. Genet.* 7: 1907-1912, 1998.
- Howe, J. R.; Ringold, J. C.; Summers, R. W.; Mitros, F. A.; Nishimura, D. Y.; Stone, E. M. : A gene for familial juvenile polyposis maps to chromosome 18q21.1. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 1129-1136, 1998.
- Hruban RH, Petersen GM, Ha PK, Kern SE. :Genetics of pancreatic cancer: from genes to families. *Surg. Oncol. Clin. N. Amer.* 7: 1-23 (1998)
- Hruban RH, Van Mansfeld ADM, Offerhaus JG, van Weering DH, Allisson DC, Goodman SN, et al. :K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. *Am. J. Pathol.* 143: 545-554 (1993)
- Iggo, R.; Gatter, K.; Bartek, J.; Lane, D.; Harris, A. L. : Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679, 1990.
- Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. : DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(24):9436-40.
- Isobe, M.; Emanuel, B. S.; Givol, D.; Oren, M.; Croce, C. M. : Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320: 84-85, 1986.
- Itakura J, Ishiwata T, Friess H, Fujii H, Matsumoto Y, Buchler MW, Korc M. : Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. *Clin Cancer Res.* 1997 Aug;3(8):1309-16.
- Iwabuchi, K.; Bartel, P. L.; Li, B.; Marraccino, R.; Fields, S. : Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 6098-6102, 1994.

-
- Jacks T, Weinberg RA: Cell-cycle control and its watchman. *Nature* 1996 Jun 20 381:6584 643-4
 - Jeffrey, P. D.; Gorina, S.; Pavletich, N. P. : Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267: 1498-1502, 1995.
 - Jenkins, J. R.; Rudge, K.; Chumakov, P.; Currie, G. A. : The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature* 317: 816-818, 1985.
 - Kamb, A.; Gruis, N. A.; Weaver-Feldhaus, J.; Liu, Q.; Harshman, K.; Tavitigian, S. V.; Stockert, E.; Day, R. S., III; Johnson, B. E.; Skolnick, M. H. : A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440, 1994.
 - Kamb, A.; Shattuck-Eidens, D.; Eeles, R.; Liu, Q.; Gruis, N. A.; Ding, W.; Hussey, C.; Tran, T.; Miki, Y.; Weaver-Feldhaus, J.; McClure, M.; Aitken, J. F.; Anderson, D. E.; Bergman, W.; Frants, R.; Goldgar, D. E.; Green, A.; MacLennan, R.; Martin, N. G.; Meyer, L. J.; Youl, P.; Zone, J. J.; Skolnick, M. H.; Cannon-Albright, L. A. : Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature Genet.* 8: 22-26, 1994.
 - Kemp, C. J.; Wheldon, T.; Balmain, A. : p53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis. *Nature Genet.* 8: 66-69, 1994.
 - Khanna, K. K.; Keating, K. E.; Kozlov, S.; Scott, S.; Gatei, M.; Hobson, K.; Taya, Y.; Gabrielli, B.; Chan, D.; Lees-Miller, S. P.; Lavin, M. F. : ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nature Genet.* 20: 398-400, 1998.
 - Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. : Landscaping the cancer terrain. *Science* 280: 1036-1037, 1998.
 - Kloppel G, Heitz PU. : Classification of normal and neoplastic neuroendocrine cells.
 - Knudson AG. : Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1;90(23):10914-21.
 - Knudson AG. : Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(3):135-40.
 - Knudson, A.G. (1971), *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68, 820-23.
 - Koch K. : Erstmals Trendwende der Krebsmortalität in USA. *Dt. Ärztebl.* 93: B-2478 (1996)
 - Koh, J.; Enders, G. H.; Dynlacht, B. D.; Harlow, E. : Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 375: 506-510, 1995.
 - Kozuka S, Sassa R, Taki T, Masamoto K, Nagasawa S, Saga S, Hasegawa K, Takeuchi M. Relation of pancreatic duct hyperplasia to carcinoma. *Cancer.* 1979 Apr;43(4):1418-28.

-
- Krawczak, M.; Smith-Sorensen, B.; Schmidtke, J.; Kakkar, V. V.; Cooper, D. N.; Hovig, E. : Somatic spectrum of cancer-associated single basepair substitutions in the TP53 gene is determined mainly by endogenous mechanisms of mutation and by selection. *Hum. Mutat.* 5: 48-57, 1995.
 - Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J. : A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 1999 Apr 1;13(7):804-16.
 - Kuukasjarvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola J. : Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. (1997); *Genes, chromosomes & Cancer* 18:94-101.
 - Kuukasjärvi, T., Tanner, M., Pennanen, S., Karhu, R., Visakorpi, T., Isola, J. Lamb, P.; Crawford, L. : Characterization of the human p53 gene. *Molec. Cell. Biol.* 6: 1379-1385, 1986.
 - Law, J. C.; Strong, L. C.; Chidambaram, A.; Ferrell, R. E. : A germ line mutation in exon 5 of the p53 gene in an extended cancer family. *Cancer Res.* 51: 6385-6387, 1991.
 - Lee, J. M.; Bernstein, A. : p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90: 5742-5746, 1993.
 - Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. : The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer.* 1994 Mar;69(3):409-16
 - Levine, A. J. : p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331, 1997.
 - Levine, A. J.; Momand, J.; Finlay, C. A. : The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991.
 - Li FP, Fraumeni JF Jr. :Soft tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: a familial syndrome? *Ann. Intern. Med.* 71: 747-752 (1969)
 - Lisitsyn, N. A.; Lisitsina, N. M.; Dalbagni, G.; Barker, P.; Sanchez, C. A.; Gnarr, J.; Linehan, W. M.; Reid, B. J.; Wigler, M. H. : Comparative genomic analysis of tumors: detection of DNA losses and amplification. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 151-155, 1995.
 - Little, M.; Wainwright, B. : Methylation and p16: suppressing the suppressor. *Nature Med.* 1: 633-634, 1995.
 - Lottspeich, F., Zorbas, H. : *Bioanalytik, Spektrum.*
 - Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg Å, Domellöf L. :Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *New. Engl. J. Med.* 328: 1433-1437 (1993)

-
- Lukas, J.; Parry, D.; Aagaard, L.; Mann, D. J.; Bartkova, J.; Strauss, M.; Peters, G.; Bartek, J. : Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 375: 503-506, 1995.
 - Luttges J, Reinecke-Luthge A, Mollmann B, Menke MA, Clemens A, Klimpfinger M, Sipos B, Kloppel G. : Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution. *Virchows Arch.* 1999 Nov;435(5):461-8.
 - Lynch HT, Fitzsimmons ML, Smyrk TC. Familial pancreatic cancer: clinopathologic study of 18 nuclear families. *Am. J. Gastroenterol.* 85: 54-60 (1990)
 - Lynch HT, Fusaro L, Lynch JF. :Familial pancreatic cancer: a family study. *Pancreas* 7: 511-515 (1992)
 - Lynch HT, Fusaro L, Smyrk TC, Watson P, Lanspa S, Lynch JF. Medical genetic study of eight pancreatic cancer prone families. *Cancer Invest.* 13: 141-149 (1995)
 - Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR: Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 104: 1535-1549 (1993)
 - Lynch HT. :Cancer and the family history trail. *N.Y. State J. Med.* 91: 145-147 (1991)
 - Lynch, H. T.; Fusaro,L.; Smyrk, T. C.; Watson, P.; Lanspa, S.; Lynch, J. F. : Medical genetic study of eight pancreatic cancer-prone families. *Cancer Invest.* 13: 141-149, 1995.
 - MacGeoch, C.; Bishop, J. A.; Bataille, V.; Bishop, D. T.; Frischauf, A. M.; Meloni, R.; Cuzick, J.; Pinney, E.; Spurr, N. K. : Genetic heterogeneity in familial malignant melanoma. *Hum. Molec. Genet.* 3: 2195-2200, 1994.
 - MacGrogan, D.; et al.; et al : Comparative mutational analysis of DPC4 (Smad4) in prostatic and colorectal carcinomas. *Oncogene* 15: 1111-1114, 1997.
 - MacKie, R. M.; Andrew, N.; Lanyon, W. G.; Connor, J. M. : CDKN2A germline mutations in U.K. patients with familial melanoma and multiple primary melanomas. *J. Invest. Derm.* 111: 269-272, 1998.
 - Madrazo-de la Garza J, Hill ID, Lebenthal E. :Hereditary pancreatitis. In Go V.L. (Hrsg.): *The Pancreas: Biology, pathobiology, and disease.* Raven Press: New York (1993), S. 1095-1101
 - Malats N, Porta M, Corominas JM, Pinol JL, Rifa J, Real FX. : Ki-ras mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinico-pathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. PANK-ras I Project Investigators. *Int J Cancer.* 1997 Mar 17;70(6):6617.

-
- Malkin, D.; Li, F. P.; Strong, L. C.; Fraumeni, J. F., Jr.; Nelson, C. E.; Kim, D. H.; Kassel, J.; Gryka, M. A.; Bischoff, F. Z.; Tainsky, M. A.; Friend, S. H. : Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250: 1233-1238, 1990. *Mamm Genome*. 1997;8(11):836-40.
 - Mazoyer, S.; Lalle, P.; Moyret-Lalle, C.; Marçais, C.; Schraub, S.; Frappaz, D.; Sobol, H.; Ozturk, M. : Two germ-line mutations affecting the same nucleotide at codon 257 of p53 gene, a rare site for mutations. *Oncogene* 9: 1237-1239, 1994.
 - McBride, O. W.; Merry, D.; Givol, D. : The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 130-134, 1986.
 - Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. : 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med*. 1995 Jul;1(7):686-92.
 - Merlo GR, Venesio T, Bernardi A, Cropp CS, Diella F, Cappa AP, Callahan R, Liscia DS. : Evidence for a second tumor suppressor gene on 17p linked to high S-phase index in primary human breast carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994 Sep;76(2):106-11.
 - Miller, C.; Mohandas, T.; Wolf, D.; Prokocimer, M.; Rotter, V.; Koeffler, H. P. : Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 319: 783-784, 1986.
 - Moskaluk CA, Hruban RH, Schutte M, Lietman AS, Smyrk T, Fusaro L, Fusaro R, Lynch J, Yeo CJ, Jackson CE, Lynch HT, Kern SE. : Genomic sequencing of DPC4 in the analysis of familial pancreatic carcinoma. *Diagn Mol Pathol*. 1997 Apr;6(2):85-90.
 - Nagata Y, Abe M, Motoshima K, Nakayama E, Shiku H: Frequent glycine-to-aspartic acid mutations at codon 12 of c-Ki-ras gene in human pancreatic cancer in Japanese. *Jpn J Cancer Res*. 1990 Feb;81(2):135-40.
 - Nakamura, T.; Pichel, J. G.; Williams-Simons, L.; Westphal, H. : An apoptotic defect in lens differentiation caused by human p53 is rescued by a mutant allele. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 6142-6146, 1995.
 - Nicol, C. J.; Harrison, M. L.; Laposa, R. R.; Gimelshtein, I. L.; Wells, P. G. : A teratologic suppressor role for p53 in benzo[a]pyrene-treated transgenic p53-deficient mice. *Nature Genet*. 10: 181-187, 1995.
 - Niehrs C: Growth factors. Mad connection to the nucleus. *Nature*. 1996 Jun 13;381(6583):561-2.
 - Nigro, J. M.; Baker, S. J.; Preisinger, A. C.; Jessup, J. M.; Hostetter, R.; Cleary, K.; Bigner, S. H.; Davidson, N.; Baylin, S.; Devilee, P.; Glover, T.; Collins, F. S.; Weston,

-
- A.; Modali, R.; Harris, C. C.; Vogelstein, B. : Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708, 1989.
- Nobori, T.; Miura, K.; Wu, D. J.; Lois, A.; Takabayashi, K.; Carson, D. A. : Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368: 753-756, 1994.
 - Pavletich, N. P.; Chambers, K. A.; Pabo, C. O. : The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev.* 7: 2556-2564, 1993.
 - Phelan CM, Lancaster JM, Tonin P, Gumbs C, Cochran C, Carter R, et al. :Mutation analysis of the BRCA2 gene in 49 site-specific breast cancer families. *Nature Genet.*13: 120-122 (1996)
 - Polyak, K.; Xia, Y.; Zweler, J. L.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. : A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389: 300-305, 1997.
 - Pomerantz, J.; Schreiber-Agus, N.; Liegeois, N. J.; Silverman, A.; Alland, L.; Chin, L.; Potes, J.; Chen, K.; Orlow, I.; Lee, H.-W.; Cordon-Cardo, C.; DePinho, R. A. : The Ink4a tumor suppressor gene product, p19(Arf), interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92: 713-723, 1998.
 - Porter AC, Dallman MJ. : Gene targeting: techniques and applications to transplantation.
 - Pour PM, Sayed S, Sayed G. : Hyperplastic, preneoplastic and neoplastic lesions found in 83 human pancreases. *Am J Clin Pathol.* 1982 Feb;77(2):137-52.
 - Qiagen Genomic DNA Handbook, Qiagen GmbH, Hilden.
 - Quelle, D. E.; Cheng, M.; Ashmun, R. A.; Sherr, C. J. : Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16(INK4a) but not by the alternative reading frame protein p19(ARF). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 669-673, 1997.
 - Quelle, D. E.; Zindy, F.; Ashmun, R. A.; Sherr, C. J. : Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83: 993-1000, 1995.
 - Ranade, K.; Hussussian, C. J.; Sikorski, R. S.; Varmus, H. E.; Goldstein, A. M.; Tucker, M. A.; Serrano, M.; Hannon, G. J.; Beach, D.; Dracopoli, N. C. : Mutations associated with familial melanoma impair p16(INK4) function. *Nature Genet.* 10: 114-116, 1995.
 - Rao VB. : Direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Anal Biochem.* 1994 Jan;216(1):1-14.

-
- Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, et al. :p53 mutations in pancreatic adenocarcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res.* 54: 3025-3033 (1994)
 - Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D: High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996 Aug 15;56(16):3630-3.
 - Reisman, D.; Balint, E.; Loging, W. T.; Rotter, V.; Almon, E. : A novel transcript encoded within the 10-kb first intron of the human p53 tumor suppressor gene (D17S2179E) is induced during differentiation of myeloid leukemia cells. *Genomics* 38: 364-370, 1996.
 - Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, Weinstein CL, Kern SE, Hamilton SR, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. : Mad-related genes in the human. *Nat Genet.* 1996 Jul;13(3):347-9.
 - Riley DJ, Lee EY, Lee WH. : The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:1-29.
 - Robert-Koch-Institut. :Geschätzte Zahl der Neuerkrankungen nach Krebsarten in Deutschland 1993. Robert-Koch-Institut-Schriften 2 (1995).
 - Roth, J. A.; Nguyen, D.; Lawrence, D. D.; Kemp, B. L.; Carrasco, C. H.; Ferson, D. Z.; Hong, W. K.; Komaki, R.; Lee, J. J.; Nesbitt, J. C.; Pisters, K. M. W.; Putnam, J. B.; Schea, R.; Shin, D. M.; Walsh, G. L.; Dolormente, M. M.; Han, C.-I.; Martin, F. D.; Yen, N.; Xu, K.; Stephens, L. C.; McDonnell, T. J.; Mukhopadhyay, T.; Cai, D. : Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nature Med.* 2: 985-990, 1996.
 - Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. :Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 1997 May 1;57(9):1731-4.
 - Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. 2. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - Sanchez-Cespedes M, Cairns P, Jen J, Sidransky D: Degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR): evaluation of its reliability for screening of genetic alterations in neoplasia. *Biotechniques.* 1998 Dec;25(6):1036-8.
 - Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG. :

Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 1997 Aug 1;57(15):3126-30.

- Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, Bova GS, Isaacs WB, Cairns P, Nawroz H, Sidransky D, Casero RA Jr, Meltzer PS, Hahn SA, Kern SE. : DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res.* 1996 Jun 1;56(11):2527-30.
- Schutte, M.; da Costa, L. T.; Hahn, S. A.; Moskaluk, C.; Hoque, A. T. M. S.; Rozenblum, E.; Weinstein, C. L.; Bittner, M.; Meltzer, P. S.; Trent, J. M.; Yeo, C. J.; Hruban, R. H.; Kern, S. E. : Identification by representational difference analysis of a homozygous deletion in pancreatic carcinoma that lies with the BRCA2 region. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 5950-5954, 1995.
- Schutte, M.; Hruban, R. H.; Hedrick, L.; Cho, K. R.; Nadasdy, G. M.; Weinstein, C. L.; Bova, G. S.; Isaacs, W. B.; Cairns, P.; Nawroz, H.; Sidransky, D.; Casero, R. A., Jr.; Meltzer, P. S.; Hahn, S. A.; Kern, S. E. : DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res.* 56: 2527-2530, 1996.
- Sears LE, Moran LS, Kissinger C, Creasey T, Perry-O'Keefe H, Roskey M, Sutherland E, Slatko BE: CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques.* 1992 Oct;13(4):626-33.
- Sedlacek, Z.; Kodet, R.; Kriz, V.; Seemanova, E.; Vodvarka, P.; Wilgenbus, P.; Mares, J.; Poustka, A.; Goetz, P. :Two Li-Fraumeni syndrome families with novel germline p53 mutations: loss of the wild-type p53 allele in only 50% of tumours. *Brit. J. Cancer* 77: 1034-1039, 1998.
- Serrano, M.; Hannon, G. J.; Beach, D. : A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707, 1993.
- Serrano, M.; Lee, H.-W.; Chin, L.; Cordon-Cardo, C.; Beach, D.; DePinho, R. A. : Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85: 27-37, 1996.
- Seymour AB, Hruban RH, Redston M, Caldas C, Powell SM, Kinzler KW, Yeo CJ, Kern SE. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1994 May 15;54(10):2761-4.
- Shibata T, Sato T, Kondo H, Ootani I, Suzuki H, Kawada S. : [Two cases of obstructive jaundice due to extrahepatic carcinoma of the bile duct with marked response to daily oral administration of etoposide]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1990 Dec;17(12):2429-32. Japanese.
- Sheffield V. C., Beck J. S., Kwiet A. E., Sanstrom D. W., Stone E., M. : *Genomics* 16; 325-332 (1993).

-
- Silverman DT, Brown LM, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Swanson GM, Hayes RB, Greenberg RS, Benichou J, Schwartz AG, Liff JM, Pottern LM. :Alcohol and pancreatic cancer in blacks and whites in the United States. *Cancer Res.* 55: 4899-4905 (1995)
 - Slatko BE. : Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol Biol.* 1994;31:35-45.
 - Smit, V. T. H. B. M.; Boot, A. J. M.; Smits, A. M. M.; Fleuren, G. J.; Cornelisse, C. J.; Bos, J. L. : KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res.* 16: 7773-7782, 1988.
 - Smith-Sorensen, B.; Hovig, E. : CDKN2A (p16-INK4A) somatic and germline mutations. *Hum. Mutat.* 7: 294-303, 1996.
 - Snabes MC, Chong SS, Subramanian SB, Kristjansson K, DiSepio D, Hughes MR. : Preimplantation single-cell analysis of multiple genetic loci by whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jun 21;91(13):6181-5.
 - Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. :Transmission test for linkage disequilibrium: The insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am. J. Hum. Genet.* 52: 506-516 (1993)
 - Stott, F. J.; Bates, S.; James, M. C.; McConnell, B. B.; Starborg, M.; Brookes, S.; Palmero, I.; Ryan, K.; Hara, E.; Vousden, K. H.; Peters, G. : The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* 17: 5001-5014, 1998.
 - Strachan, T., Read, A. P. : *Molekulare Humangenetik, Spektrum.*
 - Su GH, Hruban RH, Bansal RK, Bova GS, Tang DJ, Shekher MC, Westerman AM, Entius MM, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE: Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers.
 - Tada M, Ohashi M, Shiratori Y, Okudaira T, Komatsu Y, Kawabe T, Yoshida H, Machinami R, Kishi K, Omata M. : Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. *Gastroenterology.* 1996 Jan;110(1):227.
 - Takahashi, T.; D'Amico, D.; Chiba, I.; Buchhagen, D. L.; Minna, J. D. : Identification of intronic point mutations as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer. *J. Clin. Invest.* 86: 363-369, 1990.
 - Takaku, K.; Oshima, M.; Miyoshi, H.; Matsui, M.; Seldin, M. F.; Taketo, M. M. : Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 92: 645-656, 1998.

-
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A. : Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*. 1992 Jul;13(3):718-25.
 - Teng DH, Bogden R, Mitchell J, Baumgard M, Bell R, Berry S, Davis T, Ha PC, Kehrer R, Jammulapati S, Chen Q, Offit K, Skolnick MH, Tavtigian SV, Jhanwar S, Swedlund B, Wong AK, Kamb A: Low incidence of BRCA2 mutations in breast carcinoma and other cancers. *Nat Genet*. 1996 Jun;13(2):241-4.
 - Thiagalingam, S.; Lengauer, C.; Leach, F. S.; Schutte, M.; Hahn, S. A.; Overhauser, J.; Willson, J. K. V.; Markowitz, S.; Hamilton, S. R.; Kern, S. E.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. :Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nature Genet*. 13: 343-346, 1996.
 - Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir I, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavtigian SV et al. :A single BRCA2 mutation in male and female breast carcinoma families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nature Genet*. 13: 117-119 (1996)
 - Urban T, Ricci S, Grange JD, Lacave R, Boudghene F, Breittmayer F. :Detection of c-Ki-ras mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst*. 24: 2008-2012 (1993)
 - Varley, J. M.; McGown, G.; Thorncroft, M.; Cochrane, S.; Morrison, P.; Woll, P.; Kelsey, A. M.; Mitchell, E. L. D.; Boyle, J.; Birch, J. M.; Evans, D. G. R. : A previously undescribed mutation within the tetramerisation domain of TP53 in a family with Li-Fraumeni syndrome (sic). *Oncogene* 12: 2437-2442, 1996. *Virchows Arch*. 1998 Oct;433(4):297-304.
 - Vivian G. Cheung and Stanley F. Nelson (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; 93:14676-79.
 - Vogelstein, B.; Fearon, E. R.; Kern, S. E.; Hamilton, S. R.; Preisinger, A. C.; Nakamura, Y.; White, R. : Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244: 207-211, 1989.
 - Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. : p53 function and dysfunction. *Cell* 70: 523-526, 1992.
 - Wallrapp C, Müller F, Pillasch S, Lichter P, Friess H, Büchler M, Fink T, Adler G, Gress T: Characterization of a high copy number amplification at 6q24 in pancreatic cancer identifies c-myc as a candidate oncogene. *Cancer research* 57. 3135-3139, 1997.
 - Weikard R, Goldammer T, Kuhn C, Barendse W, Schwerin M. : Targeted development of microsatellite markers from the defined region of bovine chromosome 6q21-31.
 - Weinberg, R. A. (1995), *Cell* 81, 323-330.

-
- Weyrer K, Feichtinger H, Haun M, Weiss G, Ofner D, Weger AR, Umlauf F, Grunewald K. : p53, Ki-ras, and DNA ploidy in human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Lab Invest.* 1996 Jan;74(1):279-89.
 - Whelan AJ, Bartsch D, Goodfellow PJ: A familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med.* 333: 975-977 (1995)
 - Wiley LM, Adamson ED, Tsark EC. : Epidermal growth factor receptor function in early mammalian development. *Bioessays.* 1995 Oct;17(10):839-46. Review.
 - Wright DK, Manos MM. :Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* San Diego: Academic Press 1990: 153-158
 - Xiao Y, Darroudi F, Kuipers AG, de Jong JH, de Boer P, Natarajan AT. : Generation of mouse chromosome painting probes by DOP-PCR amplification of microdissected meiotic chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 1996;75(1):63-6.
 - Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG, Uchida E, Onda M, Kobrin MS, Korc M. : Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res.* 1993 Nov 1;53(21):5289-96.
 - Zawel, L.; Dai, J. L.; Buckhaults, P.; Zhou, S.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Kern, S. E. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Molec. Cell* 1: 611-617, 1998.
 - Zhang, W.; Funk, W. D.; Wright, W. E.; Shay, J. W.; Deisseroth, A. B. : Novel DNA binding of p53 mutants and their role in transcriptional activation. *Oncogene* 8: 2555-2559, 1993.
 - Zhou, S.; Buckhaults, P.; Zawel, L.; Bunz, F.; Riggins, G.; Le Dai, J.; Kern, S. E.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. : Targeted deletion of Smad4 shows it is required for transforming growth factor beta and activin signaling in colorectal cancer cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 2412-2416, 1998.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Jeserich für das Gutachten dieser Arbeit.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Dr. S.A. Hahn, dem Leiter des molekularenkologischen Labors der medizinischen Universitätsklinik Bochum Langendreer, der als Zweitgutachter zur Verfügung stand. Ferner möchte ich ihm danken, daß er mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht sowie für seine Unterstützung zur Anfertigung dieser Arbeit.

Ferner bedanke mich ich bei der gesamten Prüfungskommission.

Zuletzt danke ich dem gesamten Personal des molekularenkologischen Labors sowie der IMBL-Arbeitsgruppe in Bochum für ihren extrem freundlichen Umgang.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist.

Hamid Galehdari

Osnabrück 2000

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Galehdari
 Vorname: Hamid
 Geburtsort: Iran-Abadan
 Geburtsdatum: 01.05.63
 Staatsangehörigkeit: Iranisch
 Muttersprache: Persisch

Schulbildung:

1970-1975 Grundschule
1975-1978 Mittlere Reife
1978-1982 Gymnasium
1982-1983 Kriegsbedingte Zwangspause
1983-1984 Abitur
1984-1986 Angestellte im Iran

.....

1987 Einreise nach Deutschland

.....

Hochschulbildung:

1988-1989 Studienkolleg in Münster
1989 (WS) Beginn des Studiums an der Universität Osnabrück
1990-1991 Krankheitsbedingte Beurlaubung
1996 (April) Abschluss im Fach Biologie (Diplom)
1997 (Januar) Beginn der Doktorarbeit