

Aus der Klinik für Chirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. P. Bruch

**Nachweis von K-*ras* Mutationen in disseminierten Tumorzellen im
Knochenmark bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom mittels
einer allelspezifischen Polymerasekettenreaktion**

Inauguraldissertation
Zur
Erlangung der Doktorwürde
Der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Lars Paulenz
aus Bremen

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer Broll

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.11.2005

Gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

-Dekan der medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	5
1.1 Kolorektales Karzinom	5
1.1.1 Entstehung.....	5
1.1.2 Das K-ras-Gen und die K-ras Mutationen	6
1.1.3 Klinik und Diagnostik	8
1.1.3.1 Klinik	8
1.1.3.2 Diagnostik.....	8
1.1.4 Therapie und Prognose	10
1.1.4.1 Therapie.....	10
1.1.4.2 Prognose	11
1.2 Disseminierte Tumorzellen	12
1.3 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)	13
1.3.1 Mutant – Allel – Specific – Amplification – Polymerase – Chain – Reaction (MASA-PCR)	13
1.4 Fragestellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Einwegmaterial	16
2.1.2 Geräte	16
2.1.3 Chemikalien	18
2.1.4 Fertigkits	19
2.1.5 Lösungen und Enzyme	20
2.1.6 Analysegele	21
2.1.7 Zelllinien	22
2.1.8 DNA- Längenstandard	22
2.1.9 Thermostabile DNA-Polymerasen und Kits	22
2.1.10 Primer	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Probengewinnung	24
2.2.1.1 Knochenmark	25
2.2.1.2 Tumorgewebe.....	25
2.2.1.2.1 Erstellung von Hämatoxylin-Eosin-Präparaten	25
2.2.1.3 Tumorzelllinien.....	26
2.2.1.3.1 Kultivierung der Tumorzelllinien	26
2.2.1.3.2 Serielle Verdünnungsreihen von Tumorzelllinien.....	26
2.2.2 Probenaufarbeitung (DNA-Isolierung) und Aufbewahrung	27
2.2.2.1 DNA-Extraktion aus Knochenmark und den seriellen Verdünnungsreihen.....	27
2.2.2.2 DNA-Extraktion aus frischem Tumorgewebe	29
2.2.2.3 DNA-Extraktion aus paraffineingebettetem Tumorgewebe	29
2.2.3 Qualitätskontrolle der genomischen DNA und der PCR-Produkte	30
2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.3.2 Kontrolle der DNA-Menge mittels Photometrie und Einstellen der Konzentration	31
2.2.3.3 Kontrolle mittels PCR.....	31
2.2.4 MASA-PCR und Optimierung der Bedingungen.....	33

2.2.4.1 Variation der Annealingtemperatur, der Zyklenzahl und der Magnesiumionenkonzentration	35
2.2.4.2 Variation der eingesetzten dNTP-Konzentration	36
2.2.4.3 Variation der eingesetzten DNA-Konzentration	36
2.2.4.4 Betrachtung einer möglichen Störung der MASA-PCR durch die β -Globin Primer	37
2.2.4.5 Einsatz unterschiedlicher DNA-Polymerasen	37
2.2.4.6 „Nested PCR“ („ineinandergeschachtelte PCR“)	38
2.2.4.8 Optimierung der PCR-Bedingungen bei Verwendung weiterer MASA-Primer	40
2.2.4.9 Optimierte MASA-PCR Bedingungen	41
2.2.5 Multiplex-ASPCR	42
2.2.6 Sequenzierung	42
2.2.7 Temporal Temperature Gradient Elektrophoresis (TTGE)	45
3. Ergebnisse	47
3.1 Optimierung der MASA-PCR-Bedingungen	47
3.1.1 Variation der Annealingtemperatur, Zyklenzahl und Magnesiumionen-konzentration	47
3.1.2 Variation der eingesetzten dNTP-Menge	49
3.1.3 Variation der eingesetzten DNA-Menge	50
3.1.4 Betrachtung einer möglichen Störung der MASA-PCR durch die β -Globin Primer	50
3.1.5 Einsatz unterschiedlicher Polymerasen	51
3.1.6 „Nested PCR“	52
3.1.7 Übertragung der optimierten MASA-PCR-Bedingungen auf Verdünnungs-reihen von Tumorzellen im Knochenmark	52
3.1.9 Ergebnisse der Multiplex-ASPCR	54
3.2 Nachweis von K-ras Mutationen im Frischtumorgewebe, im paraffingebetteten Tumorgewebe und im Knochenmark der Tumor-Patienten- und der Patienten-Kontrollgruppe mittels der MASA-PCR	54
3.2.1 K-ras Mutationen im frischen Tumorgewebe	55
3.2.2 K-ras Mutationen im paraffineingebetteten Tumorgewebe	55
3.2.3 K-ras Mutationen im Knochenmark in der Tumor-Patienten-Gruppe	56
3.2.4 K-ras Mutationen im Knochenmark in der Patienten-Kontrollgruppe	57
3.3 Nachweis von K-ras Mutationen in der Sequenzierung	58
3.4 Temporal Temperature Gradient Elektrophoresis (TTGE)	60
3.5 Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Analyse-Methoden	61
3.6 Analyse der Patientendaten	62
4. Diskussion	64
4.1 Literaturübersicht	64
4.2 Vergleich der angewandten Methodik mit in der Literatur beschriebenen Untersuchungen	71
4.3 Kritische Einordnung der eigenen Ergebnisse mit früheren Untersuchungen und daraus resultierende Schlussfolgerungen	75
5. Zusammenfassung	79
6. Literaturverzeichnis	81
7. Anhang	91
8. Danksagungen	99
9. Lebenslauf	101

Abkürzungen

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CK	Zytokeratin
CEA	Karzino embryonales Antigen
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	DNA spaltendes Enzym
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli
FKS	Fötales Kälberserum
FOBT	Fäkaler Okkultter Bluttest
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Differenzierungsgrad eines Tumors
G	Guanin
GDP	Guanindiphosphat
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HNPCC	Hereditäres Nichtpolypöses Kolokarzinom Syndrom
I.E.	Internationale Einheiten
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
M	Metastasierungsgrad
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N	Lymphknotenbefall
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
T	Tumorausdehnung
T	Thymin
U	Units
V	Volt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
5-FU	5-Fluoruracil
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate

1. Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist ein sporadisch und familiär vorkommender maligner Tumor des Dickdarms mit häufig eruierbarer positiver Familienanamnese und Vorläuferläsionen in Form von Adenomen (Riede und Schäfer, 1995). Es hat in der Bevölkerung eine Inzidenz von ca. 30 auf 100.000 Einwohner pro Jahr. 90 % aller kolorektalen Karzinome treten nach dem 50. Lebensjahr auf. Zur Zeit ist das kolorektale Karzinom das dritthäufigste Karzinom weltweit (Eickhoff et al., 2003). In Deutschland ist das kolorektale Karzinom nach dem Prostata- und Bronchialkarzinom bei den Männern das dritthäufigste und bei den Frauen nach dem Mamma-Karzinom das zweithäufigste Karzinom (Knöpnadel et al., 2003, Herold, 2003). Histologisch handelt es sich fast ausschließlich um Adenokarzinome mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden. Unter die schlecht differenzierten Adenokarzinome fällt das muzinöse Adenokarzinom, auch Gallertkarzinom genannt, welches in circa 10 % der Fälle auftritt. Histologische Sonderformen wie plattenepitheliale, klarzellige, choriokarzinomatöse und kleinzellige Karzinome treten nur in einer geringeren Prozentzahl auf (Riede und Schäfer, 1995, Herold, 2003).

1.1.1 Entstehung

Für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms gibt es mehrere ätiologische Faktoren.

1. Ernährung: eine fette, fleischreiche und ballaststoffarme Ernährung.
2. Hereditäre Faktoren und Syndrome: a) die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP), eine obligate Präkanzerose, welche ca. 1% aller kolorektalen Karzinome ausmacht, b) das Lynch Syndrom oder auch Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer (HNPCC) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, welche ca. 5 % aller kolorektalen Karzinome ausmacht. Typischerweise tritt bei Patienten mit einem HNPCC das Karzinom im Mittel 10-15 Jahre früher auf als in der Normalbevölkerung. c) eine positive Familienanamnese ist ein weiterer Risikofaktor in der Entstehung kolorektaler Karzinome.
3. Risikoerkrankungen: a) entzündliche Darmerkrankungen, insbesondere eine langjährig verlaufende Kolitis ulcerosa mit einem Risiko zwischen 8 und 30 % nach 25 Jahren Erkrankungsdauer ein kolorektales

Karzinom zu entwickeln, b) der Zustand nach Anlage einer Uretersigmoidostomie, c) das Vorhandensein von kolorektalen Adenomen, Karzinomen von Mamma, Ovar und Corpus uteri. 4. andere Risikofaktoren: Langjähriger Tabakgebrauch und Alkoholkonsum sind ebenfalls als Risikofaktoren anzusehen (Mayer, 2001, Herold 2003).

Die Entstehung kolorektaler Karzinome verläuft in 80 - 90 % der Fälle über die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz. Dieser Begriff wurde von Muto et al. 1975 eingeführt. Das von Vogelstein et al. (1988) entwickelte Tumorprogressionsmodell zur Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt eine Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen in Verbindung mit den histologischen Veränderungen vom gesunden Kolonepithel bis zum manifesten Karzinom (s. Abb. 1). Die Reihenfolge der dargestellten Veränderungen im Rahmen der Tumorprogression kann variieren. Den Phasen der Karzinomentstehung können typische genetische Veränderungen zugewiesen werden. Es handelt sich hierbei um Aktivierungen von Onkogenen (z.B. *K-ras*) und Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen (z.B. p53, DCC, APC).

1.1.2 Das K-ras-Gen und die K-ras Mutationen

Das *K-ras*-Gen ist ein Proto-Onkogen, welches auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 liegt. Es gehört zu einer Genfamilie mit 3 unterschiedlichen Genen, die so genannten *H-ras*, *N-ras* und *K-ras*. Diese 3 Gene kodieren jeweils für ein 21 kDa schweres Protein. Dieses Protein ist (in seiner normalen Form und Funktion) an der Signaltransduktion und damit an der Beeinflussung von Wachstum und Differenzierung beteiligt. Das (normale) Genprodukt bindet mit hoher Affinität Guaninnukleotide. Im aktiven Zustand ist das Protein an GTP gebunden. Den inaktiven Zustand kennzeichnet die Bindung an GDP. Im Rahmen der Signalvermittlung hat das aktive, an GTP gebundene Protein, nur eine sehr kurze Aktivität. Das liegt an einer raschen Hydrolyse des GTP zu GDP durch die Interaktion des Ras-Proteins mit dem Ras-GTPase Aktivating Protein (Ras-GAP). Kommt es zu einer Strukturveränderung des Ras-Proteins aufgrund einer Genmutation, ist diese Interaktion und damit die hydrolytische Aktivität gestört. Die Konsequenz daraus ist eine Störung der normalen Signaltransduktion. Eine Beeinflussung des Zellwachstums und ein Schritt in der Entwicklung eines malignen Tumors ist die Folge (Wittinghofer und Pai, 1991, Fearon, 1993, Span et al. 1996). Dies spiegelt sich darin wider, dass in kleinen Adenomen (<1 cm) in weniger als 10 % *K-ras* Mutationen gefunden werden. Im

Gegensatz dazu finden sich in mehr als 50 % der Adenome, die größer als 1 cm, sind *K-ras*-Mutationen (Vogelstein et al., 1988).

Die *K-ras*-Mutation findet in einer frühen Phase der Tumorentstehung statt (s. Abb. 1).

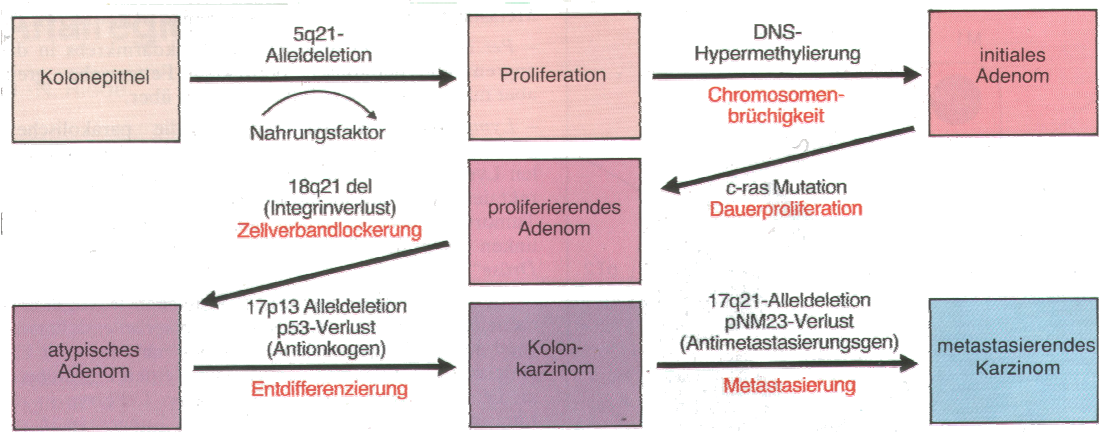


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz (aus: Riede und Schäfer, Allgemeine und spezielle Pathologie, Abb. 12.72, 4. Auflage, 1995)

Bei kolorektalen Karzinomen findet sich eine Häufigkeit von *K-ras*-Mutationen in 40-50 % der Fälle (Bos et al., 1987, Forrester et al., 1987). Die *ras*-Mutationen, die in der Tumorentstehung eine Rolle spielen, ereignen sich als Punktmutationen an Codon 12, 13 und 61 mit deutlich unterschiedlicher Häufigkeit. In der Verteilung finden sich ca. 80 % der Mutationen in Codon 12, ca. 10 % in Codon 13 und Mutationen in Codon 61 in ca. 5% der Fälle (Bos et al., 1987, Andreyev et al., 1998, Kampmann et al., 2000). Auch die Häufigkeit der Mutation innerhalb eines Codon ist unterschiedlich verteilt. Beispielsweise liegen in Codon 12 (GGT) 60 % der Mutationen an der ersten Base und je ca. 20 % der Mutationen an der 2. und 3.Position (Span et al., 1996).

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der *K-ras* Mutationen zeigte die große Multicenter-Studie „Rascal“ (Andreyev et al., 1998) ein signifikant erhöhtes Risiko für Tod und Rezidiv bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom, welche eine Mutation des *K-ras* Gens aufwiesen. *Ras*-Mutationen konnten in verschiedenen weiteren Tumorentitäten nachgewiesen werden. So lassen sich z.B. in Adenokarzinomen des Pankreas in 75-90 % und in Adenokarzinomen der Lunge in 30 % *K-ras*-Mutationen nachweisen (Fearon, 1993).

1.1.3 Klinik und Diagnostik

1.1.3.1 Klinik

Die Symptomatik von kolorektalen Karzinomen ist sehr uncharakteristisch. Es gibt keine zuverlässigen Frühsymptome. Zudem variieren die Symptome abhängig von der Lokalisation im Darm, so dass eine Früherkennung oftmals nicht möglich ist. So können aufgrund der flüssigen Stuhlkonsistenz Tumoren im Rechtscolon eine beträchtliche Größe erreichen, bevor sie Stuhlunregelmäßigkeiten hervorrufen. Typischerweise neigen diese Tumoren zu Ulcerationen. Daher fallen Patienten mit einem Karzinom des rechtsseitigen Kolon häufig erst mit einem tastbaren Tumor oder durch Symptome wie Abgeschlagenheit, Müdigkeit, evtl. pektanginöse Beschwerden, Dyspnoe und Leistungsminderung auf, die auf einer hypochromen, mikrozytären Anämie durch den chronischen Blutverlust beruht. Bei einer Tumorlokalisation, die weiter distal liegt, im Colon transversum oder descendens, treten aufgrund des zunehmend eingedickten Stuhls häufig Stuhlunregelmäßigkeiten, z.B. paradoxe Diarrhöen auf. Aufgrund der zunehmenden Stenosierung des Lumens durch den Tumor kommt es im Verlauf zu zunehmenden kolikartigen abdominellen Schmerzen. Bei einer Tumorlokalisation im Bereich des Rectosigmoides kommt es häufig zu sichtbaren Blutbeimischungen zum Stuhl. Weiterhin klagen diese Patienten über Tenesmen und Veränderungen des Stuhlkalibers, z.B. bleistiftartigen Stuhl (Winkler und Braun, 1994, Mayer, 2001, Herold, 2003).

Ca. 15 % aller Patienten mit einem kolorektalen Karzinom kommen durch eine Notfallsituation (mechanischer Ileus 64,3 %, Perforation 20,5%, Blutung 5,6% und Kombinationen 9,5%) zur Erstdiagnose (Hohenberger et al. 2003).

1.1.3.2 Diagnostik

Im Rahmen der Diagnostik sind Screeningverfahren zur Früherkennung besonders wichtig, da eine frühzeitige Diagnose die Möglichkeit einer kurativen Operation bietet. Das Outcome der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom ist nach einer operativen Therapie stark abhängig vom Stadium der Erkrankung. Die American Cancer Society empfiehlt eine jährliche digitale rektale Untersuchung ab dem 40. Lebensjahr, da ca. 20 % aller kolorektalen Karzinome im Rektum lokalisiert sind. Eine alle 3-5 Jahre durchgeführte flexible Rectosigmoidoskopie wird ebenfalls durch die American Cancer Society empfohlen, da aufgrund der Lokalisation der kolorektalen Karzinome in diesen Darmabschnitten, ca. 75 % aller Tumoren erfasst werden können (Mayer, 2001).

In Deutschland war bis September 2002 ein jährlicher FOBT ab dem 45. Lebensjahr im Rahmen der gesetzlichen Früherkennung enthalten. Allerdings nahmen nur 34 % der berechtigten Frauen und nur 14 % der berechtigten Männer diese Möglichkeit der Früherkennung in Anspruch. Seit Oktober 2002 wird im Rahmen der gesetzlichen Früherkennung ein jährlicher FOBT zwischen dem 50. und 54. Lebensjahr empfohlen. Ab dem 56. Lebensjahr ist eine vollständige Coloskopie vorgesehen, die bei einem unauffälligen Befund nach 10 Jahren wiederholt werden kann. Alternativ sieht die gesetzliche Früherkennung einen FOBT alle 2 Jahre vor. Die entsprechenden Fachgesellschaften empfehlen allerdings einen jährlichen FOBT aufgrund der von Mandel et al. (1993, 1999) in Minnesota durchgeführten Studien, bei der sich eine Verbesserung der Mortalitätsrate bei jährlicher im Gegensatz zur zweijährlichen Testung zeigen ließ (Pox et al., 2002).

Die Aussagekraft der FOBT ist begrenzt. So zeigte sich, dass ein einmalig durchgeführter FOBT eine Sensivität von 50 % bei Karzinomen, 12 % bei Adenomen und 22 % bei Risikoadenomen (tubuläre Adenome > 1 cm mit villösen Anteilen oder hochgradigen Dysplasien) aufweist. Die Spezifität des Testes lag bei 94 % (Liebermann und Weiss, 2001). Dies gilt allerdings nur für den einmaligen Test. Im Rahmen von Screeningprogrammen konnte der regelmäßig durchgeführte FOBT eine relative Mortalitätsreduktion zwischen 13 und 33 % zeigen (Kronborg et al., 1996, Mandel et al., 1999, Scholefield et al., 2002, Jorgensen et al., 2002). Die Reduzierung der Mortalität ist in der früheren Diagnosestellung und damit einer früheren Operation zu sehen.

Risikogruppen wie Patienten mit einer FAP oder dem Lynch Syndrom unterliegen speziellen Vorsorgemaßnahmen mit einer jährlichen vollständigen Ileocoloskopie. Die einzige Methode mit der ca. 98 % aller kolorektalen Karzinome, sowie noch viel wichtiger die Vorläufer wie z. B. kleine asymptomatische Adenome, erfasst werden können, ist die vollständige Coloskopie. Bei einem klinischen Verdacht auf ein kolorektales Karzinom muss unbedingt eine vollständige Coloskopie durchgeführt werden. Hierbei können suspekte Läsionen biopsiert werden und Polypen, die kleiner als 3 cm im Durchmesser sind, komplett abgetragen und histologisch aufgearbeitet werden. Sollte keine vollständige Coloskopie möglich sein, z. B. aufgrund eines stenosierenden Tumors, muss unbedingt eine weitere Diagnostik (z. B. Röntgen-Kolondoppelkontrast) zum Ausschluß eines Zweitkarzinoms, wie es in 2-4 % aller Fälle auftritt, erfolgen (Stallmach und Köhne, 1999). Beim Nachweis eines kolorektalen Karzinoms sind weitere Staging-Untersuchungen notwendig, wie die Computertomographie des Abdomens, die

Sonographie des Abdomens und ein Röntgen-Thorax. Im Rahmen der Diagnostik sollte ein Ausgangswert des Carcino–Embryonalen–Antigens (CEA) im Serum bestimmt werden, da im Verlauf ein ansteigendes CEA im Serum einen Hinweis auf ein Rezidiv oder eine Metastase gibt.

1.1.4 Therapie und Prognose

1.1.4.1 Therapie

Bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms muss zwischen palliativer und kurativer Operation unterschieden werden. Bei ca. 5 % der Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon ein präfinaler Zustand vorhanden (Hohenberger et al., 2003). Bei diesen Patienten kommen ausschließlich palliative Maßnahmen in Betracht. Ziel der chirurgisch-kurativen Therapie ist die radikale Tumorresektion, R0–Resektion, unter Einbeziehung der regionären Lymphknoten und Einhaltung der jeweiligen Sicherheitsabstände. Je nach Tumorlokalisation kommen verschiedene operative Verfahren in Frage. Beim Kolonkarzinom im Bereich des Zökum die Hemicolektomie rechts, im Bereich des Colon ascendens die Hemicolektomie rechts, im Bereich der rechten Colonflexur die erweiterte Hemicolektomie rechts, bei Befall des Colon transversum die erweiterte Hemicolektomie rechts, bei Befall des mittleren und linken Colon die erweiterte Transversumresektion unter Einschluß beider Flexuren und im Bereich des Colon descendens die erweiterte Hemicolektomie links. Beim Rectumkarzinom kommen je nach Tumorlokalisation die anteriore und tiefe anteriore Rektumresektion, die abdominoperanale intersphinktare Resektion und die abdominoperineale Rektumextirpation in Betracht (Winkler und Braun, 1994, Hohenberger et al., 2003). Bei sämtlichen Operationen, mit kurativen Ansatz, eines kolorektalen Karzinoms sollte wenn möglich immer die so genannte „No-touch isolation technique“ zur Anwendung kommen um eine Aussaat von Tumorzellen unter der Operation zu reduzieren (Hayashi et al., 1999).

Eine adjuvante Chemotherapie senkt nach einer R0–Resektion das Risiko einer Metastasierung bei Kolonkarzinomen im Stadium III nach UICC und verbessert damit die 5–Jahresüberlebensrate (5–JÜR) signifikant (Mayer, 2001). Im Rahmen der adjuvanten Chemotherapie kommen 5–Fluorouracil (5–FU) + Levamisol oder Folinsäure zur Anwendung. Ob beim Kolonkarzinom Stadium II nach UICC eine adjuvante Therapie sinnvoll ist, muss noch in Studien geklärt werden. Die vorliegenden Studienergebnisse

widersprechen sich teilweise. So kommt die Studie des National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (Mamounas et al., 1999) zu der Schlussfolgerung, dass diese Patienten ebenfalls von einer adjuvanten Therapie profitieren. Andere Studiengruppen sehen bei Patienten im Stadium II keine signifikante Verbesserung der 5-JÜR durch eine adjuvante Chemotherapie (IMPACT B2, 1999).

Bei Rektumkarzinomen im Stadium II und III ist eine Verbesserung der 5-JÜR und eine signifikante Verminderung von lokoregionären Rezidiven nach kombinierter Radio-/Chemotherapie nachgewiesen (Herold, 2003).

Isolierte Lungen- oder Lebermetastasen können unter kurativer Zielsetzung entfernt werden. Hier ist eine neoadjuvante Chemotherapie bei nicht primär resezierbaren Lebermetastasen unter Umständen sinnvoll. Ob dies einen signifikanten Vorteil hinsichtlich einer verbesserten 5-JÜR bringt, ist noch nicht endgültig geklärt (Seufferlein et al., 2003)

1.1.4.2 Prognose

Die mittlere 5-JÜR beträgt etwa 50 % (Frauen 51 %, Männer 48 %) (Seufferlein et al., 2003). Die Prognose der Patienten ist allerdings stark abhängig vom Tumorstadium in der eine kurative, chirurgische Therapie (R0-Resektion) durchgeführt wurde. So hat ein Patient mit einem kolorektalen Karzinom im UICC-Stadium I, dies entspricht Dukes A oder T1N0M0, eine 5-JÜR von >90 %. Dagegen hat ein Patient mit einem kolorektalen Karzinom im UICC-Stadium IV, entspricht Dukes D oder TxNxM1, eine 5-JÜR von nur ca. 5% (Mayer 2001). In Tabelle 1 sind die durchschnittlichen 5-JÜR in Bezug auf das entsprechende Tumorstadium (nach UICC, Dukes und TNM-Stadium) dargestellt.

UICC-Stadium	Definition	TNM-System	Dukes Stadien	5-Jahres-überleben
I	Ia. Beschränkung auf Mukosa und Submukosa	T1 N0 M0	A	85 - >90%
	Ib. Infiltration der Muscularis Propria	T2 N0 M0		
II	Infiltration aller Wandschichten Überschreitung der Darmwand	T3 N0 M0 T4 N0 M0	B	70 – 80 %
III	Regionale Lymphknoten oder Infiltration der Umgebung	Tx N1-3 M0	C	35 – 65 %
IV	Fernmetastasen	Tx Nx M1	D	5 %

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach UICC, Dukes und TNM – Klassifikation mit durchschnittlichen 5-Jahresüberlebensraten (Umgezeichnet aus Herold, Innere Medizin 2003, S. 414 und Mayer, Harrison's Principles of Internal Medicine, S. 585, 15th Edition, 2001)

Die weitere Lebenserwartung wird entscheidend von den lokoregionären Rezidiven und der Entwicklung von Fernmetastasen bestimmt. Die meisten lokoregionären Rezidive kolorektaler Karzinome treten in den ersten 4 Jahren nach dem Beginn der kurativen Therapie auf. Die Häufigkeitsangaben für das Auftreten eines Rezidiv sind in der Literatur mit 15-30 % angegeben. Davon treten ca. 70 % nach einem Jahr und 85-90 % nach 2 Jahren auf. Hier ist in der Nachsorge das CEA ein zuverlässiger Marker (Mayer, 2001).

Ca. 50 % aller Fernmetastasen treten in Form von Lebermetastasen auf. Bereits bei der Erstdiagnose sind bei 15 -25 % der Patienten Fernmetastasen vorhanden (74 % Leber, 10 % Lunge, Rest andere) (Hohenberger et al, 2003). Im weiteren Verlauf werden auch nach mehr als 6 Monaten bei weiteren 20 % der Patienten Lebermetastasen auch nach kurativer Tumorsektion gefunden. Die Patienten, die trotz kurativer R0-Resektion ein erhöhtes Risiko für Rezidive und Spätmetastasen haben, gilt es durch zusätzliche, z. B. molekulare Diagnostik herauszufiltern, um sie einer sinnvollen adjuvanten Therapie zuzuführen, und um Patienten, die kein erhöhtes Risiko für lokoregionäre Rezidive oder Fernmetastasen haben, eine belastende und nebenwirkungsreiche Therapie zu ersparen.

1.2 Disseminierte Tumorzellen

Eine Aussaat von Tumorzellen in die verschiedenen Kompartimente wie die Peritonealhöhle, die Blutbahn oder das Knochenmark ist lange bekannt. So konnten Lucke und Klebs bereits 1867 über Tumorzellen in der Peritonealspülflüssigkeit und Pool und Dunlop 1934 über Tumorzellen in der Blutbahn berichten. In den folgenden Jahrzehnten wurden in vielen weiteren Studien zirkulierende Tumorzellen in der Blutbahn, in Lymphknoten, im Stuhl, in der intraoperativ gewonnenen Peritonealspülflüssigkeit und im Knochenmark mit unterschiedlichen zytologischen und molekularen Methoden nachgewiesen (Hardingham et al., 1993, Hayashi et al. 1995, Soeth et al., 1997, Denis et al., 1997, Zippelius et al., 1997, Hibi et al., 1998, Broll et al., 1999). Ob es sich dabei um Zellabschilferungen, um eine Begleiterscheinung der Grunderkrankung (Residual Disease) oder um ein wirklich metastatisches Potenzial handelt, ist noch nicht endgültig geklärt. (O'Sullivan et al.,1997). Zur prognostischen Bedeutung dieser Zellen konnte in den bisherigen Studien keine eindeutige Aussage gemacht werden. Allerdings ist das Vorliegen von Tumorzellen im Knochenmark bei verschiedenen Tumoren wie dem

Kolorektalen-, Magen-, Lungen, Prostata- und Mammakarzinom in den meisten Studien als prognostisch ungünstiger Faktor gesehen worden (Schlimok et al., 1990 und 1991, Lindemann et al., 1992, Andreyev und Cunningham, 1997).

1.3 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine gentechnische Methode, die in den 80-er Jahren entwickelt wurde (Saiki et al., 1985). Dieses Verfahren erlaubt es, beliebige DNA-Stücke zu vervielfältigen. Im Idealfall reicht eine DNA-Vorlage aus, um die Vervielfältigung zu starten. Das Prinzip beruht auf einer festgelegten Abfolge von drei Reaktionsschritten, die in einem geeigneten Thermocycler mit einer thermostabilen Polymerase durchgeführt werden. Hierbei müssen im ersten Schritt (Denaturierung) die beiden DNA-Doppelstränge durch Erhitzen auf 95°C voneinander getrennt werden. Im zweiten Schritt (Annealing) hybridisieren nach Abkühlung auf die sogenannte Annealingtemperatur (40 bis 70°C) zwei sogenannte Primer mit den DNA-Strängen. Bei den Primern handelt es sich um Oligonukleotide, welche komplementär zu jeweils einem Strang der zu untersuchenden DNA-Sequenz sind. Nach der Hybridisierung kommt es im dritten Schritt durch die thermostabile Polymerase, bei einer für diese optimalen Temperatur, zur DNA-Synthese. Bei einer n-fachen Wiederholung dieser Reaktionsabfolge mit demselben Reaktionsgemisch wird der gewünschte DNA-Bereich exponentiell vervielfältigt. Die Länge des vervielfältigten DNA-Bereiches wird durch die Lage der Primer auf den DNA-Strängen definiert.

1.3.1 Mutant – Allel – Specific – Amplification – Polymerase – Chain – Reaction (MASA-PCR)

Die Mutant-Allel-Specific-Amplification-Polymerase-Chain-Reaction (MASA-PCR) (Takeda et al., 1993) und die Multiplex-Allel-Specific-PCR (Multiplex-ASPCR) (Losi et al., 1992) bauen auf der von Wu et al. (1989) beschriebenen „Allel-Specific-PCR“ auf. Das Prinzip der MASA-PCR beruht darauf, dass unter optimalen Bedingungen nur komplementäre Basen miteinander hybridisieren, und es daher nur bei passender Basenpaarung am 3'-Ende des entsprechenden Primers zu einer weiteren Elongation des

Primers und damit einer Transkription des DNA-Stranges kommt. Im Rahmen der Untersuchungen von Takeda et al. (1993) und Losi et al. (1992) wurden *K-ras* Mutationen in Zellen des Sputums bei Patienten mit einem Lungenkarzinom bzw. im Gewebe von kolorektalen Karzinomen untersucht. Bei der MASA-PCR des *K-ras* Gen machte man sich zu Nutze, dass es sich um Punktmutationen in ganz bestimmten Codons (Codon 12, 13 oder 61, s. 1.1.2), so genannten „Hotspots“, handelt (Vogelstein et al., 1988, Fearon et al., 1990, Losi et al., 1992).

Zum Nachweis der Mutationen wurden Primer eingesetzt, die an ihrem 3'-Ende eine für eine bestimmte Punktmutation komplementäre Base tragen. Bei Basenpaarung am 3'-Ende erfolgt die Verlängerung des Primers und damit die Transkription des DNA-Stranges. Sollte es zu keiner Basenpaarung kommen, wird die Verlängerung abgebrochen (s. Abbildung 2).

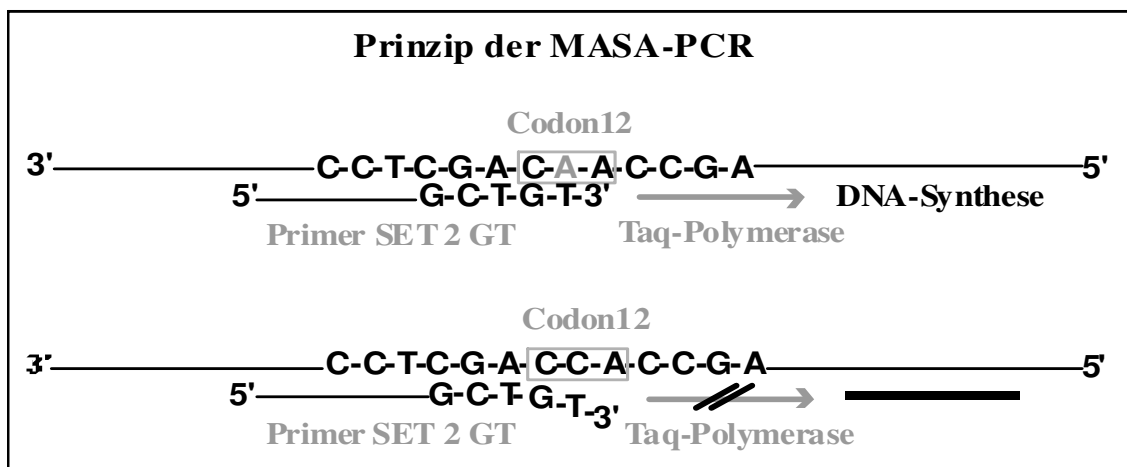


Abbildung 2: Prinzip der MASA-PCR mit einem Primer zum Nachweis einer Mutation in Kodon 12 des *K-ras*-Gens von GGT zu GTT. Oben: erfolgreiche PCR bei Vorliegen einer Mutation in Kodon 12 zweite Stelle. Unten: keine DNA-Synthese bei Wildtyp-DNA durch C, T Basenmismatch.

Um die Zahl der notwendigen PCR-Ansätze zu reduzieren, die man benötigen würde, um alle an Codon 12 und 13 vorliegenden Mutationen des *K-ras* Gens zu untersuchen, haben Losi et al. (1992) die sogenannte „Multiplex-Allele-Specific“-PCR (Multiplex-ASPCR) eingeführt. Bei dieser Form der MASA-PCR werden die drei Primer, die notwendig sind um die drei möglichen Punktmutationen eines Codons (erste, zweite oder dritte Stelle) zu analysieren, gleichzeitig in einem Reaktionsansatz zusammengefügt. Bei einem Nachweis einer Mutation in dieser Reaktion kann in einer nachfolgend durchgeführten MASA-PCR,

bei der die Primer getrennt in jeweils gesonderte Reaktionsansätze gegeben werden, die Punktmutation dann genau nachgewiesen werden. Die Multiplex-ASPCR kann somit als vereinfachter Suchtest angesehen werden.

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob der Nachweis einer *K-ras*-Mutation mit Hilfe einer der MASA-PCR eine geeignete Methode zur Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmarkaspirat von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom ist. Hierzu war es notwendig, die Bedingungen der MASA-PCR an das Medium Knochenmark anzupassen und sie so zu optimieren, dass eine ausreichend niedrige Nachweisgrenze für disseminierte Tumorzellen und eine sichere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erzielt werden konnte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Einwegmaterial

Einweghandschuhe	Peha-soft (Hartmann, Heidenheim)
Kryogefäß	Cellstar, Cryo.S (Greiner Bio-one, Frickenhausen)
Kulturflasche	Nunclon TN Surface 200 ml (Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark)
Monovetten	Ammonium-EDTA (Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen	10, 100, 1000, 2000 µl DNase/RNase freie Biosphere Filtertips (Sarstedt AG, Nümbrecht)
Reaktionsgefäß	2 ml, 1,5 ml, 200µl (Greiner Bio-one, Frickenhausen)
Reaktionsröhrchen	Cellstar Tubes 15 ml und 50 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen)
Skalpell	Cutfix (B. Braun, Melsungen)
Standardspritze	Injekt 20 ml (B. Braun, Melsungen)

2.1.2 Geräte

Autoklav	Autoklav (Webeco, Bad Schwartau)
Beckenkammpunktionsnadel	Ulmer Nadel, Modell Ulrich (Ulrich Medizintechnik, Ulm)
Brut- und Begasungsschrank	CO ₂ Autozero (Heraeus, Hanau)
Elektrophoresekammer	horizontale Elektrophoresekammer (Fröbel, Lindau)

Mikrodysmembranator	Mikro-Dismembranator II (B. Braun, Melsungen)
Mikrotom	Jung SM 2000R (Leica, Nussloche)
Mikroskop	Axiovert 10 (Zeiss, Jena)
Pipetten	Eppendorf Reference und Research 2000, 1000, 10-100, 0,5-10 µl (Eppendorf, Hamburg)
Photodokumentationssystem	UV-Transilluminator 312nm (MWG Biotech, Ebersberg)
Photometer	DU 640 Spectrophotometer (Beckmann Coulter, Fullerton, USA)
Scanner	Duoscan T1200 (AGFA, Köln)
Sequenzierungsgerät	DNA Sequencer 4000L (Fa. Li-Cor MWG Biotech, Ebersberg)
Spannungsquelle	Power Pac 300 (Bio Rad, München)
Sterilbank	Class II, TypA/B3 (Nuair, Plymouth, USA)
Thermocycler	-Thermocycler 1 (Perkin and Elmer, Mannheim) -Primus 96 plus (MWG Biotech, Ebersberg)
Thermomixer	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
TTGE-Kammer	Dcode Universal Mutation Detection System (Bio Rad, München)
Vortex	Typ VF 2, IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Wärmeschränk	Typ ST 6060 /(Heraeus Instruments, Hanau)
Wärmebad	Wärmebad (GFL, Burgwedel)
Zählkammer	Neubauer (Brand, Ludwigshafen)
Zentrifugen	-Megafuge 1.0R (Heraeus, Hanau) -Biofuge 22R (Heraeus, Hanau)

2.1.3 Chemikalien

In den Versuchen wurden Chemikalien mit dem höchst möglichen Reinheitsgrad verwendet.

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Gibco-BRL, Eggenstein
Agarose, Ultra-Pure	Gibco-BRL, Eggenstein
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FKS)	Clontech, Heidelberg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
HEPES – Puffer (1M)	Gibco – BRL, Eggenstein
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L–Glutamin (200 mM)	Gibco – BRL, Eggenstein
Long Ranger	Biozym, Oldendorf
Methanol	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
PCR-Wachs	Chil Out Wax, Biozym, Oldendorf
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Penicillin (10.000 U/ml-Streptomycin (10.000UG/ml))	Gibco-BRL, Eggenstein
Phenol (wassergesättigt)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium ohne Glutamin	Gibco – BRL, Eggenstein
Saccharose	Merck, Darmstadt

TEMED	Gibco – BRL, Eggenstein
Türk'sche Lösung	Merck, Darmstadt
Tris–Base	Merck, Darmstadt
Trypan Blue Solution	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4 Fertigkits

QIAGEN Blood & Cell Culture

-DNA Mini Kit

-Cell Lysis Buffer (C1 Buffer): 50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 50 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Tween-20, 0,5 % (v/v) Triton X-100 (pH 8,0)

-General Lysis Buffer G 2 Buffer): 800 mM Guanidine-HCl, 30 mM Tris-Cl (pH 8,0), 30 mM EDTA (pH 8,0), 5 % (v/v) Tween-20, 0,5 % (v/v) Triton X-100

-Equilibration Buffer (QBT Buffer): 750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 % (v/v) Isopropanol

-Wash Buffer (QC Buffer): 1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 % (v/v) Isopropanol

-Elution Buffer (QF Buffer): 1,25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 8,5), 15 % (v/v) Isopropanol

-QIAGEN Protease 20 mg/ml, Aktivität 45 mAU/mg, lyophilisiert

-RNase A 100 mg/ml

-QIAGEN Genomic-tips (mini)
(QIAGEN GmbH, Hilden)

-DNA Midi Kit

QIAGEN Genomic-tips (midi)

weiterer Inhalt siehe oben

(QIAGEN GmbH, Hilden)

2.1.5 Lösungen und Enzyme

Digestions-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 5 mM EDTA,
1% (w/v) SDS

dNTP

Ultrapure 2'-Desoxynukleosid-5'-Tri-
phosphate, Konzentration 100 mM,
(Pharmacia, Freiburg)

Entwicklerlösung

1,5 % (w/v) NaOH-Formaldehyd, 0,4 %
(v/v) Formaldehyd 35-40 %, H₂O

Ethanol 70%

70 % (v/v) Ethanol 100%, H₂O

Fixierlösung

10% (v/v) Methanol, 0,5 % (v/v)
Essigsäure, H₂O

Heparin

Heparin-Natrium Braun 5000 I.E./0,5 ml,
(B. Braun, Melsungen)

H₂O

hochreines Millipor Wasser, autoklaviert

Laufpuffer

1,25 X TAE-Puffer

Nachentwickler

0,75 % (w/v) Na₂CO₃

Proteinase K

20 mg/ml, Aktivität > 600 mAU/ml,
(Qiagen, Hilden)

RNAse A

100 mg/ml, 7000 U/ml, (Qiagen, Hilden)

Schwerelösung für

-Agarose-Gel (10x)

0,25 % (w/v) Xylencyanol, 40 % (w/v)
Saccharose, 0,1 M EDTA (pH 8,0) in H₂O

-TTGE-Gel (2x)

0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v)
Xylenlcyanol, 70 % (v/v) Glycerin in H₂O

Silbernitratlösung

0,1 % (w/v) AgNO₃ in H₂O

Stop/Loading Buffer (10 ml)

0,2 ml EDTA (0,5 M), 9,5 ml Formamid
(deionisiert), 10 mg Bromphenol-blau ad
10 ml H₂O

TAE-Puffer (50x)	2 M Tris Base, 10 mM EDTA, 5,7 % (v/v) Eisessig, ad 1000 ml H ₂ O, pH 8,3 - 8,5
TBE Long Run (10x)	1340 mM Tris Base, 450 mM Borsäure, 25 mM EDTA auf 1 l H ₂ O, pH 8,3 - 8,7
TE-Puffer	10 mM Tris – Cl, pH 8, 1 mM EDTA, pH 8
Trypsin/EDTA	0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA
Wachstumsmedium	RPMI 1640 Medium ohne Glutamin auf 500 ml Gesamtvolumen nach Zusatz von 5 ml Penicillin - Streptomycin, 50 ml Fötale Kälberserum, 5 ml L – Glutamin (200 mM), 3 ml HEPES – Puffer (1M), pH 7,2-7,5
5 M NH ₄ –Acetat-Lösung	5 M Ammoniumacetat in H ₂ O
3 M Natrium–Acetat-Lösung	3 M Natriumacetat in H ₂ O

2.1.6 Analysegele

Agarosegel	1 oder 2% (w/v) Agarose in 50 ml TAE-Puffer mit Ethidiumbromid 1 µg/ml
Polyacrylamidgel	10% (w/v) Acrylamid/Bis, 7M Harnstoff, 1,25 X TAE-Puffer, je 30 ml Acrylamid-lösung mit 270 µl, 10 % (w/v) APS und 27µl TEMED
Sequenziergel, 41 cm lang, 0,25 mm dick	6,5 ml Long Ranger 50 %, 21 g Harnstoff, 5 ml 10 X TBE Long Run, 450 mM Borsäure, 25 mM EDTA ad 1000 ml H ₂ O mit 500 µl DMSO, 50 µl TEMED, 350 µl APS 10%

2.1.7 Zelllinien

Kolonkarzinom Zelllinie SW 480
(DSMZ No ACC 313)

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig

Lungenkarzinom Zelllinie A 549
(DSMZ No ACC 107)

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig

2.1.8 DNA- Längenstandard

λ -DNA
Molekulargewichtsmarker XIII

0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 48,5 kb, (Roche, Mannheim)
DNA-Konzentration 250 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 15 doppel-
strängige DNA-Fragmente in Abständen zu
50 bp, Bande 250 und 500 sind zwei- bis
dreifach verstärkt, zusätzliche Bande bei
2642 bp (Roche, Mannheim)

2.1.9 Thermostabile DNA-Polymerasen und Kits

Ampli-Taq Stoffelfragment

Polymerase (5 U/ μl),
(Perkin and Elmer, Mannheim)

Pfu-Polymerase-Kit

Polymerase (5 U/ μl), Promega 10 x PCR-
Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,8, 100 mM
KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 20 mM MgSO_4 , 1
mg/ml nuclease-free BSA, 1% (v/v) Triton
X-100), (Promega, Mannheim)

Qia-Taq Kit

Polymerase (5 U/ μl), Qia 10 x PCR-Puffer
(Tris-Cl, KCL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 mM MgCl_2 ,
pH 8,7), (Qiagen, Hilden)

Taq-Polymerase-Kit

Polymerase (5 U/ μ l),
10 x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl),
Magnesiumchloridlösung (50 mM MgCl_2),
(Gibco-BRL, Eggenstein)

Thermosequenase

Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit mit 7-deaza-dGTP enthält: A Reagenz: ddATP, C Reagenz: ddCTP, G Reagenz ddGTP, T Reagenz: ddTTP mit je Tris-HCl (pH 9,5), Magnesiumchlorid, Tween 20, Nonidet P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deazad GTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase (Amersham, Braunschweig)

2.1.10 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech Europe (Ebersberg) hergestellt. Die Primer wurden alle vom 3'-Ende beginnend synthetisiert. Dieses Ende ist in der MASA-PCR entscheidend für die spezifische Hybridisierung. Da bei der Primersynthese immer Syntheseabbrüche auftreten können, ist dies ein wichtiger Punkt. Die Primer wurden alle über eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt um möglicherweise entstandene verkürzte Oligonukleotide zu entfernen.

Die Basensequenz und Benennung der Primer ist in den Kapiteln, in denen sie benutzt wurden, in tabellarischer Form aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Bei den Patienten, die in diese Studie eingeflossen sind, handelte es sich um Patienten mit einem prä-operativ erstmalig gesicherten kolorektalen Karzinom oder um Patienten mit dem hochgradigen Verdacht darauf. Als Kontrollgruppe dienten Patienten ohne bekanntes Tumorleiden, die sich einer Operation eines Bauchaortenaneurysmas unterzogen. Alle Patienten wurden am Tag vor der Operation über die Studie, die Entnahme des Knochenmarks und die damit möglicherweise verbundenen Komplikationen mündlich und schriftlich aufgeklärt. Alle eingeschlossenen Patienten haben sich schriftlich mit der Entnahme des Knochenmarks und der Teilnahme an der Studie einverstanden erklärt. Ein Antrag an die Ethikkommission der Medizinischen Universität zu Lübeck wurde am 21.05.1997 unter der Nr. AZ 97-042 genehmigt. Ausschlusskriterien waren ein bekanntes Zweitkarzinom oder ein Rezidivkarzinom.

Insgesamt konnte von 74 Patienten ausreichend Knochenmark gewonnen werden. Davon mussten im Verlauf insgesamt 12 Patienten ausgeschlossen werden. Bei acht Patienten war postoperativ histologisch kein Karzinom nachweisbar und ein Patient zeigte intraoperativ einen inoperablen Befund, so dass kein Tumorgewebe gewonnen wurde. Die weiteren drei Patienten mussten im Verlauf ausgeschlossen werden, da sich aus den Paraffinschnitten des Tumorgewebes keine für die PCR verwertbare DNA isolieren ließ. Somit flossen insgesamt 62 Patienten als Untersuchungsgruppe ein. Der Altersrange betrug 46-88 Jahre. Das Altersmittel der Patienten betrug 69,83 Jahre. Nach UICC-Tumorstadien (s. Tabelle 1) teilte sich das in die Studie eingeflossenen Patientenkollektiv wie folgt auf: Stadium I: 18 Patienten (29 %), Stadium II: 23 Patienten (37,1%), Stadium III: 12 Patienten (19,4%), Stadium IV: 9 Patienten (14,5%).

In die Kontrollgruppe flossen die Daten von insgesamt 23 Patienten ein, von denen ausreichend Knochenmark gewonnen wurde. Der Altersrange der Kontrollgruppe betrug 55-79 Jahre mit einem daraus resultierenden Altersmittel von 72 Jahren.

Die Proben wurden im Zeitraum vom 15.7.1997 bis zum 09.11.1999 gesammelt.

2.2.1.1 Knochenmark

Die Gewinnung des Knochenmarkes erfolgte präoperativ, nachdem das Operationsfeld vollständig für die eigentliche Operation vorbereitet worden war. Nach einer Stichinzision über dem Beckenkamm von ventral erfolgte die Punktion des Markraumes mit einer Beckenkampunktionsnadel. In der Regel ließ sich nach einmaliger Punktion das Knochenmark aspirieren. Dieses wurde in einer 20 ml Standardspritze mit 5000 I.E. Heparin aufgenommen. Sofort nach der Entnahme wurden die Proben auf Eis gelagert und zur weiteren Verarbeitung ins Labor verbracht und anschließend bei -20°C für maximal 6 Wochen bis zur Weiterverarbeitung (s. 2.2.2.1) gelagert.

2.2.1.2 Tumorgewebe

Das Kolonresektat mit dem soliden Tumor, den Lymphknoten und dem weiteren entfernten Gewebe (Bindegewebe, Gefäße etc.) wurde direkt nach der Entnahme in das Pathologische Institut des Universitätsklinikums Schleswig–Holstein, Campus Lübeck, gebracht. Dort wurde bei einem Teil der Patienten (n=36) ein Stück des Tumors reseziert und anschließend sofort in flüssigen Stickstoff zur Konservierung überführt. Dieses frische Tumorgewebe wurde bis zur weiteren Aufarbeitung (s. 2.2.2.2) in der Tumorbank des Chirurgischen Forschungslabors des Universitätsklinikums Schleswig–Holstein, Campus Lübeck, in flüssigem Stickstoff gelagert.

Bei den Patienten (n=39), von denen direkt postoperativ kein frisches Tumorgewebe erhältlich war, konnte dieses nach der Fixierung und Einbettung in Formalin und Paraffin (im Rahmen des pathologischen Staging) aus der Tumorbank des pathologischen Instituts gewonnen werden. Dazu wurden mit einem Mikrotom je 3 Schnitte à 10 µm pro Paraffinblock des eingebetteten Tumorgewebes angefertigt und in 2ml Eppendorf-Tubes überführt. Vor dem Anfertigen der Schnitte wurde soviel überstehendes Paraffin wie möglich mit einem Skalpell entfernt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde die Mikrotomklinge nach jeder Probe mit Alkohol und autoklaviertem Wasser gereinigt. Ebenso wurde das Skalpell gereinigt bzw. gegen ein neues ersetzt.

Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung (s. 2.2.2.3) bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.1.2.1 Erstellung von Hämatoxylin-Eosin-Präparaten

Um sicherzustellen, dass es sich bei den gewonnenen Frischtumorproben um Karzinomgewebe handelte wurde von jeder Probe ein Hämatoxylin-Eosin (H-E) Präparat gefertigt. Hierzu musste ein Teil der Probe in Paraffin eingebettet werden. Anschließend

wurde mit einem Mikrotom ein 4 µm starker Schnitt angefertigt und dieser einer H-E Färbung, wie bei Chang (1972) beschrieben, unterzogen. Im Rahmen der Untersuchung der Schnitte wurde auch die Menge an Karzinomzellen im Gewebe beurteilt. Diese sollte nicht weniger als 80 % Tumorzellen betragen.

2.2.1.3 Tumorzelllinien

Die Zelllinien, die in dieser Untersuchung verwendet wurden, waren die Kolonkarzinom-Zelllinie SW 480 mit einer Mutation im Codon 12 des *K-ras*-Gen von GGT zu GTT und die Lungenkarzinom-Zelllinie A 549 mit einer Mutation im gleichen Codon von GGT zu AGT (s. 2.1.7).

2.2.1.3.1 Kultivierung der Tumorzelllinien

Die Zelllinien wurden in unserem Labor in Kulturflaschen mit 175 cm² Kulturoberfläche in 50 ml Wachstumsmedium kultiviert. Dies geschah in einem Brut- und Begasungsschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Passagen der Zellen erfolgten zweimal wöchentlich. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend in 7 ml Trypsin/EDTA für 10 min im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension in 5–8 ml Phosphat gepufferter Saline (PBS) gewaschen und bei 300 g zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in 5–8 ml Wachstumsmedium aufgenommen. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspensionen mit 90 µl Trypanblau versetzt (Verdünnung 1:10) und lichtmikroskopisch in einer Zählkammer ausgezählt. Bei dieser Färbung erscheinen nur tote Zellen als gefärbt, vitale Zellen hingegen erscheinen farblos. Von den Lösungen mit ca. 90% vitalen Zellen wurden je 10⁶ Zellen in 50 ml Wachstumsmedium in neuen Kulturflaschen angelegt oder zur Weiterverarbeitung für die seriellen Verdünnungsreihen (s. 2.2.1.3.2) gebraucht.

2.2.1.3.2 Serielle Verdünnungsreihen von Tumorzelllinien

Aus den kultivierten Tumorzelllinien (s. 2.2.1.3.1) wurden serielle Verdünnungsreihen in Vollblut bzw. Knochenmark von gesunden Probanden erstellt. Die dienten im weiteren Verlauf der Untersuchung zur Optimierung der Untersuchungsbedingungen.

Die kultivierten Tumorzellen wurden durch mehrmaliges Waschen und Zentrifugieren mit PBS vom Medium getrennt und abschließend in 5 ml PBS Puffer aufgenommen. Anschließend wurde die Zahl der Zellen in einer Neubauerzählkammer ermittelt und eine definierte Anzahl der Tumorzellen mit dem Vollblut gemischt. Um Schwankungen des

Zellgehaltes während der Verdünnung zu vermeiden wurden 5 ml Vollblut je Verdünnungsstufe eingesetzt. Bei dem Vollblut handelt es sich um peripher venöses Blut eines gesunden Probanden. Dieses wurde dem Probanden nach dessen Einwilligung in Ammonium–EDTA-Monovetten entnommen. Anschließend wurden die zellkernhaltigen und damit DNA-tragenden Zellen nach Anfärbung mit Türk'scher Lösung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Daraus ergab sich eine durchschnittliche Anzahl von 4000 Leukozyten/ μ l. Um Schwankungen in der Zellzahl zu vermeiden wurden die Verdünnungsreihen mit je 5 ml Vollblut pro Verdünnungsstufe und der entsprechenden Menge an Tumorzellen angefertigt.

Die Verdünnungsreihen galten in absteigender Reihe von $10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1, 10^0$ und 0 auf 1 ml Vollblut.

Bei den Verdünnungsreihen, die in Knochenmark erstellt wurden, wurde prinzipiell gleich vorgegangen. Zur Erstellung dieser Verdünnungsreihen wurde das Knochenmarkaspirat der Patienten aus der Kontrollgruppe verwendet. Allerdings wurde hier nicht die Konzentration an kerntragenden Elementen ausgezählt. Die Konzentrationen an Tumorzellen wurden wie oben genannt gewählt.

Die seriellen Verdünnungsreihen wurden wie in 2.2.2.1 beschrieben weiter bearbeitet.

2.2.2 Probenaufarbeitung (DNA-Isolierung) und Aufbewahrung

2.2.2.1 DNA-Extraktion aus Knochenmark und den seriellen Verdünnungsreihen

Die DNA Extraktion aus dem Knochenmark (s. 2.2.1.1) und den seriellen Verdünnungen (s. 2.2.1.3.2) erfolgte mit dem QIAGEN Blood & Cell DNA Mini Kit.

Das Verfahren zur Isolation der genomischen DNA mit dem Kit setzte sich prinzipiell aus drei Teilen zusammen: 1. Denaturierung und Lyse der Zellmembranen und Freisetzung der Zellkerne. 2. Lyse der Zellkernmembran und Freisetzung der DNA und 3. Aufreinigung der genomischen DNA.

Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Knochenmarkproben schonend aufgetaut. Die seriellen Verdünnungen wurden nach der Herstellung (2.2.1.3.2) direkt und ohne zwischenzeitliches Einfrieren nach dem gleichen Protokoll wie das Knochenmark weiter bearbeitet.

Zur Lyse der Zellmembranen und zur Freisetzung der Zellkerne aus den kerntragenden Zellen wurde 1 ml der Probe mit 1 ml des im Kit vorhandenen Zelllyse-Puffer C1 und 3 ml des gefilterten und autoklavierten H_2O in einem 15 ml Röhrchen gemischt und

anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Danach musste die Probe für 15 min mit 1300 g in der Heraeus Megafuge 1.0R bei 4°C zentrifugiert werden. Bei diesem Schritt bildete sich ein Pellet, welches aus den freigesetzten Kernen bestand. In der Regel war das Pellet noch rötlich gefärbt, was auf Residuen von Hämoglobin zurückzuführen war. Dieses ließ sich durch weitere 1-2 Waschvorgänge beheben. Hierzu wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 0,25 ml C1-Puffer und 0,75 ml H₂O resuspendiert und in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend wurde das Gemisch erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Eine gute Auswaschung des Zelldetritus war sehr wichtig, da es im weiteren Verlauf der Extraktion sonst zu Problemen und damit verbunden zu einer schlechteren Ausbeute und zur Verunreinigung der DNA hätte kommen können.

Sobald das Pellet ausreichend ungefärbt war, wurde der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml G 2 Puffer, dem General Lysis Buffer, resuspendiert. Der General Lysis Buffer lysiert die Zellkernmembran und denaturiert Proteine wie Nucleasen, Histone und virale Partikel. Anschließend kamen 25 µl Protease (im Kit enthalten) in einer Stammkonzentration von 20 mg/ml zu der Lösung, welche nun für 1 h bei 50°C inkubieren musste, bis sie klar war.

Im nächsten Schritt wurden die QIAGEN Genomic Tips auf 15 ml Röhrchen gesetzt und wie folgt vorgegangen: Auftragen von 1 ml Equilibration Buffer QBT, Vortexen der Probe und Auftragen auf die Säule, danach Waschen mit dreimal 1 ml Wash Buffer QC. Anschließend wurden die Genomic Tips auf neue 15 ml Röhrchen gesetzt, um die in den Tips gebundene DNA darin aufnehmen zu können. Damit die DNA aus den Genomic Tips gelöst werden konnte, mussten diese zweimal mit 1 ml des auf 50° C erhitzten Elution Buffer QF gewaschen werden. Um die in dem Eluat gelöste DNA zu fällen, wurden 1,4 ml Isopropanol zu der Lösung gegeben, diese für 1 h im Kühlschrank inkubiert und abschließend in der Heraeus Megafuge 1.0R mit 1500 g für 30 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Pellet leicht getrocknet und in 200 µl TE-Puffer gelöst und vorsichtig gevortext. Anschließend wurde die gelöste DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, sowie 200 µl 5 M NH₄-Acetat und 1 ml 96%iger Ethanol zugegeben und für 1 h bei -20°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gemisch in der Heraeus Biofuge 22R bei maximaler Umdrehungszahl für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet, nach guter Abtrocknung, in 50 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.2.2 DNA-Extraktion aus frischem Tumorgewebe

Die Extraktion der DNA des in der Tumorbank in flüssigem Stickstoff gelagerten Tumorgewebes erfolgte mit dem QIAGEN Blood & Cell DNA Midi Kit.

In dem ersten Schritt der Isolation musste das Gewebe homogenisiert werden. Hierzu wurden ca. 100 mg in 9,5 ml des General Lysis Buffer (G2) und 40 µl RNase A Stock Solution in einer Stammkonzentration von 100 mg/ml in ein 50 ml Röhrchen gefüllt. Anschließend wurde das Gewebe mechanisch mit Hilfe eines Mikrodysmembranators homogenisiert. Nach dem Aufspalten des Gewebes und der Denaturierung der Zellmembranen schloß sich der zweite Schritt der DNA-Extraktion an. Es erfolgte nach der Zugabe von 0,5 ml QIAGEN Protease eine Inkubation bei 50°C für 2 h. Anschließend wurde die DNA-Isolation mit Hilfe der Genomic-Tips, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, fortgesetzt. Hier wurden aufgrund der Verwendung des Midi Kits größere Puffermengen benötigt. Die Äquilibration der größeren Säulen erfolgte mit 4 ml QBT Puffer, das Waschen mit zweimal 7,5 ml QC- Puffer, die Eluierung mit 5 ml QF Puffer. Anschließend wurden 3,5 ml Isopropanol zugegeben. Hier wurde mit 50 ml Röhrchen gearbeitet. Im letzten Schritt wurde das Pellet in 200µl TE- Puffer aufgenommen.

2.2.2.3 DNA-Extraktion aus paraffineingebettetem Tumorgewebe

Die DNA Extraktion aus dem in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe erfolgte nach einer Methode von Volkenandt et al. (1991), modifiziert nach Jackson et al. (1990). Hierzu mussten die unter 2.2.1.2 vorbereiteten, in Paraffin eingebetteten Tumorproben zuerst gut entparaffinisiert werden. Dazu wurde das Tumorgewebe mit 1 ml Xylol versetzt, kurz gevortext und für 10 min in einem Thermomixer bei Raumtemperatur, unter vorsichtigem Schütteln, inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in der Biofuge 22R bei Höchstgeschwindigkeit für 5 min zentrifugiert, und anschließend konnte der entstandene Überstand, vorsichtig und ohne das Pellet zu verletzen, abgenommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Der Arbeitsschritt des Entparaffinierens musste zweimal wiederholt werden. Danach wurde das Pellet zweimal mit je 1 ml 96%igem Ethanol gewaschen, für 3 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und für 10 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand musste so komplett wie möglich entfernt werden. Dann wurde das Pellet in 150 µl Digestion-Puffer resuspendiert und mit Proteinase K in einer Endkonzentration von 500 µg/ml versetzt. Darauf folgte eine Inkubation über Nacht bei 55°C im Wärmeschrank. Nach der Inkubation im

Wärmeschrank schloss sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion der DNA an. Hierzu wurden die Proben für 5 s zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden den Proben 150 µl Phenol und 150 µl aus einem Gemisch von Chloroform und Isoamylalkohol in einem Verhältnis von 24:1 zugefügt, diese für 15 s gevortext und anschließend für 2 min bei Höchstgeschwindigkeit in der Biofuge 22R zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand konnte nun vorsichtig und ohne die darunter liegende Proteinschicht zu berühren abgenommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Der beschriebene Phenol-Chloroform-Extraktionsschritt musste insgesamt zweimal durchgeführt werden. Im nächsten Schritt wurden zu dem abgefüllten Überstand noch einmal 150 µl des Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches gegeben, für 15 s gevortext und für 2 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder vorsichtig und vollständig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte die Ethanolfällung der extrahierten DNA. Hierzu wurde jeder Probe 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und das doppelte Volumen an 96%igen, eiskalten Ethanol zugesetzt, die Probe gut durchgemischt und für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 20 min in der Biofuge 22R bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand konnte vorsichtig und ohne das DNA-Pellet zu berühren entfernt werden. Jetzt wurde das Pellet noch zweimal mit je 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach Trocknung des Pellets wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer gelöst und so bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.3 Qualitätskontrolle der genomischen DNA und der PCR-Produkte

2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der isolierten genomischen DNA und der PCR-Produkte erfolgte durch die Agarose-Gelelektrophorese. Bei den benutzten Gelen handelte es sich um 1- und 2-%ige Agarosegele mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 1 µg/ml. Zur Herstellung der Agarose Gele wurden 50 ml TAE-Puffer (einfach) mit 0,5 g Agarose für ein 1 %iges Gel und mit 1 g Agarose für ein 2 %iges Gel aufgeköcht. Nachdem sich die Agarose vollständig gelöst hatte, wurde das Ethidiumbromid zugefügt und die Lösung in eine Form gegossen. Nach Erkalten der Lösung konnten die Kämme, welche die Taschen für die Proben ausformten, entfernt werden. Anschließend wurden die Proben, 1 µl der genomischen DNA gemischt mit 9µl H₂O oder 10 µl des PCR-Produktes, in die Taschen

aufgetragen. Zu den entsprechenden Proben wurde zur Visualisierung während des Laufprozesses 1 µl der farbigen Schwerelösung dazugegeben. Die Laufzeit der Proben durch das Agarosegel in der horizontalen Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer, als Laufpuffer, betrug 1 h. Die durch die Spannungsquelle Power Pac 300 erzeugte und an das Gel angelegte Spannung betrug 10 V/cm Gellänge. Nach Ablauf der Elektrophorese konnten die DNA-Banden auf einem UV Transilluminator unter UV-Licht (Wellenlänge 312 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden. Um die Länge der entsprechenden DNA-Fragmente bestimmen zu können, lief an beiden Seiten des Agarose-Gels ein DNA-Molekular-Gewichtsmarker (Nr. XIII, Fa. Roche) mit definierten Fragmentlängen mit.

2.2.3.2 Kontrolle der DNA-Menge mittels Photometrie und Einstellen der Konzentration

Um für die Versuche möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen, wurden die DNA-Lösungen auf einheitliche Konzentrationen eingestellt. Hierzu wurde zunächst die Ausgangskonzentration der isolierten DNA photometrisch ermittelt. Zu diesem Zweck wurden 2 µl der DNA-Ausgangslösung auf 100 µl TE-Puffer (1:50) verdünnt. Die photometrische Messung der Verdünnung erfolgte in Quarzküvetten. Aufgrund der unterschiedlichen Absorption der DNA von Licht definierter Wellenlänge (260 und 280 nm) ließ sich die Konzentration an gelöster DNA in der Probe mit Hilfe der Warburg-Christian Formel (Warburg und Christian, 1941) berechnen. Anschließend konnten die Ausgangs-DNA-Proben auf eine einheitliche Konzentration (100 ng DNA auf 1 µl) eingestellt werden.

Abschließend wurde je 1 µl dieser Proben auf ein 1%iges Agarose Gel (s. 2.2.3.1) aufgetragen um starke Fragmentierungen und damit verbundene Behinderungen der folgenden Versuche auszuschließen. Als Vergleichs-DNA lief DNA aus dem Bakteriophagen λ als Längenstandard mit.

2.2.3.3 Kontrolle mittels PCR

Bei der Isolierung der DNA aus Paraffintumoren lässt sich rein quantitativ eine gute Ausbeute an DNA erzielen. Diese erweist sich jedoch in der Agarose-Gelelektrophorese als sehr stark fragmentiert. Bei sehr stark fragmentierter DNA als Templet in der MASA-PCR ist mit falsch negativen Ergebnissen zu rechnen. Die Kontrolle der DNA-Extrakte erfolgte über eine PCR, in der β -Globin-Gen spezifische Primer (s. Tabelle 2) eingesetzt

wurden. Beim Einsatz dieser Primer in einer PCR mit menschlicher DNA als Templet entsteht ein 286 bp langes DNA-Fragment.

Tabelle 2: Basensequenz der β -Globin Primer

Name	Sequenz	Position*
β -Globin 5' (Sense-Primer)	5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC -3'	72-91
β -Globin 3' (Antisense-Primer)	5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'	320-339

* bezogen auf Genebank-Accession-Nummer AY260740

Der Reaktionsansatz für die PCR wurde wie in Tabelle 3 angegeben pipettiert.

Die Reaktion lief wie folgt ab: 3 min bei 80°C, dann 27 Zyklen x (0,5 min bei 95°C + 1,5 min bei 65°C + 1 min bei 72°C). Abschließend 7 min bei 72°C und Abkühlung auf 4°C.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für Kontroll-PCR mit β -Globin-Primer

Komponente	Bezeichnung	Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Qiagen 10 X PCR Puffer incl. 15 mM MgCl ₂		10 X	5 μ l	Mg ²⁺ : 1,5 mM
Sense-Primer	β -Globin 5'	25 mM	0,2 μ l	0,1 mM
Antisense-Primer	β -Globin 3'	25 mM	0,2 μ l	0,1 mM
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 μ l	200 μ M
Polymerase	<i>Qia-Taq</i>	5 U/ μ l	0,25 μ l	1,25 U/Ansatz
H ₂ O			Ad 49,5 μ l	
DNA-Templet		100 ng/ μ l	5 μ l	10 ng/ μ l
Gesamtvolumen			50 μ l	

In jeder Reaktion wurde eine Probe mit DNA aus den seriellen Verdünnungsreihen (10^4 Tumorzellen/ μ l) als Positivkontrolle eingefügt. Als Negativkontrolle diente DNA-freier TE-Puffer. Die in der PCR entstandenen Produkte wurden auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und die Ergebnisse wie unter 2.2.3.1 beschrieben dokumentiert. In der MASA-PCR kamen nur DNA-Extrakte zur Anwendung, die ein positives Signal im Agarosegel aufwiesen und damit zeigten, dass ausreichend PCR-taugliche DNA in der Probe vorhanden war.

2.2.4 MASA-PCR und Optimierung der Bedingungen

Die MASA-PCR ist, wie unter 1.3.1 beschrieben, eine hochspezifische und –sensitive Methode zum Nachweis von *K-ras* Mutationen. Die Sensitivität und Spezifität der Methode sind allerdings stark abhängig von den PCR-Bedingungen. Da die Spezifität dieser Methode auf der spezifischen Basenpaarung am 3'-Ende beruht, war es notwendig die PCR-Bedingungen so zu optimieren, dass unspezifische Basenpaarungen weitgehend ausgeschlossen waren. Ferner sollten die Bedingungen so gewählt werden, dass eine möglichst hohe Sensitivität erzielt wurde, damit auch eine geringe Anzahl von Zellen mit einer Mutation im *K-ras*-Gen nachgewiesen werden konnte.

Die optimalen PCR-Bedingungen hängen von mehreren Faktoren ab. Hier ist die Annealingtemperatur zu nennen, bei der die spezifische Basenpaarung abläuft. Nur bei optimaler Temperaturwahl ist es möglich eine ausreichende Sensitivität bei erhaltener Spezifität zu erzielen. Weiterhin sind zu nennen die Zykluszahl, die Menge an eingesetzter DNA, die Magnesiumionenkonzentration im Reaktionsansatz, die gewählte Polymerase und die Konzentration an Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP). Alle genannten Parameter wurden, wie in der Folge beschrieben, variiert, um die optimalen PCR-Bedingungen herauszufinden.

Um Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu schaffen, war es notwendig, unter dauerhaften Standardbedingungen zu arbeiten. Daher wurden zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen die von Kwok und Higuchi (1989) beschriebenen Maßnahmen umgesetzt. Dazu wurden die PCR-Ansätze immer als Mastermix ohne Templet vorpipetiert. Hierbei wurden entsprechend der gesuchten *K-ras*-Mutation der jeweilige Sense-Primer, der Antisense-Primer (s. Tabelle 4), die β -Globinprimer (s. Tabelle 2), dNTP, Magnesiumchlorid, H₂O und die jeweilige thermostabile DNA-Polymerase in dem geeigneten Puffer (Puffer, jeweils im Kit mit Polymerase, je nach Hersteller unterschiedlich) zusammengefügt. Diese Arbeiten wurden weitgehend in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Während der gesamten Arbeit wurden Einmalhandschuhe getragen. Die benötigten Lösungen waren, soweit es möglich und notwendig war, autoklaviert. Als Pippettenspitzen kamen DNase freie Filtertips, die bei jedem Schritt gewechselt wurden, zum Einsatz. Der entstandene Ansatz wurde aliquotiert und dann das Templet, zu einem Gesamtvolumen von 50 μ l, zu den Aliquots gegeben. Abschließend wurde dieser Reaktionsansatz mit 20 μ l PCR-Wachs überschichtet.

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis pipetiert, um zu verhindern, dass unspezifische Reaktionen abliefen.

Mit Hilfe von Studien anderer Arbeitsgruppen (Takeda et al., 1993, Hayashi et al., 1994) und eigener Vorversuche wurde für die weitere Optimierung folgendes Grundkonzept erarbeitet: Am Anfang der PCR erfolgte eine dreiminütige bei 80°C durchgeführte Inkubation. Darauf folgte eine n-fach wiederholte Reaktionsabfolge mit einer Denaturierung von 0,5 min bei 95°C, einem Primerannealing von 1,5 min bei variabler Temperatur und einer Extension von 1 min bei 72°C. Daran schloss sich ein finaler Extensionsschritt von 7 min bei 72°C an. Zum Abschluss der PCR wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt.

Die Nukleotidsequenz der Primer orientierte sich an den Arbeiten von Takeda et. al (1993) und Losi et. al. (1992). In der Tabelle 4 ist die Benennung der Primer, die durch die Primer nachweisbare Mutation und die Basenabfolge der Primer angegeben. Weiterhin ist aufgeführt, welche Aminosäure in dem resultierenden Protein anstatt Glycin bei einer vorhandenen Mutation eingefügt wird.

Tabelle 4: Sense und Antisense Primer für die MASA-PCR¹

Sense-Primer				
Benennung	Kodon	Mutation	Aminosäure austausch von Glycin zu	Sequenz
SET 1 TC	12	GGT=>CGT	ARG	5'-ACT TGT GGT AGT TGG AGC TC-3'
SET 1 TT	12	GGT=>TGT	CYS	5'-ACT TGT GGT AGT TGG AGC TT- 3'
SET 1 TA	12	GGT=>AGT	SER	5'-ACT TGT GGT AGT TGG AGC TA-3'
SET 2 GT	12	GGT=>GTT	VAL	5'-CTT GTG GTA GTT GGA GCT GT-3'
SET 2 GC	12	GGT=>GCT	ALA	5'-CTT GTG GTA GTT GGA GCT GC-3'
SET 2 GA	12	GGT=>GAT	ASP	5'-CTT GTG GTA GTT GGA GCT GA-3'
SET 3 TA ²	13	GGC=>AGC	SER	5-TGT GGT AGT TGG AGC TGG TA-3'
SET 3 TC	13	GGC=>CGC	ARG	5-TGT GGT AGT TGG AGC TGG TC-3'
SET 3 GA ²	13	GGC=>GAC	ASP	5-GTG GTA GTT GGA GCT GGT GA-3'
Antisense-Primer				
K1204L	5-CTC ATG AAA ATG GTC AGA GAA ACC-3'			

¹Zugrundegelegte Sequenz: Genbank-Accession-Nummer AF285779 mit folgender Position der Primer innerhalb der Sequenz: SET 1: 468–487, SET 2: 469–488, SET 3 TA und TC: 471–490, SET 3 GA 472–491 und K1204L: 624–647.

²MASA-Primer SET 3 TA und SET 3 GA wurden nach der Optimierung der PCR nicht in die MASA eingesetzt.

Aufgrund der unterschiedlichen Position der Mutation entstehen bei Verwendung der Primer unterschiedlich lange Fragmente der DNA. Für Set 1 entstand ein 179 bp, für Set 2 ein 178 bp und für Set 3 ein 176 bp langes DNA-Fragment.

Um auszuschließen, dass es sich bei einem negativen PCR-Ergebnis um ein falsch negatives Signal aufgrund einer fehlerhaft oder unvollständig abgelaufenen PCR-Reaktion handelte, wurde als Positivkontrolle der Reaktion ein 286 bp großer Abschnitt des β -Globins mit erzeugt (s. 2.2.3.3).

Für die Optimierung der MASA-PCR-Bedingungen wurde zunächst die aus Verdünnungsreihen von SW 480-Kolonkarzinomzellen in Vollblut (s. 2.2.1.3.2) isolierte DNA mit dem Primer SET 2 GT (s. Tabelle 4) eingesetzt. Um falsch positive Signale aufgrund fehlerhafter Anfertigung der Verdünnungsreihen auszuschließen, wurden die Versuche zweimal, mit DNA aus zwei verschiedenen Verdünnungsreihen, durchgeführt. Die so optimierten Bedingungen wurden zunächst auf die in Vollblut erstellten Verdünnungsreihen von A 594-Lungenkarzinomzellen unter Verwendung des Primers SET 1 TA übertragen und anschließend für die entsprechende Mutation weiter optimiert. Nachdem in diesen Versuchsreihen die bestmögliche untere Nachweisgrenze herausgearbeitet worden war, wurden die PCR-Bedingungen auf die seriellen Verdünnungsreihen von Tumorzellen im Knochenmark übertragen.

2.2.4.1 Variation der Annealingtemperatur, der Zyklenzahl und der Magnesiumionenkonzentration

Die Variation der Parameter Annealingtemperatur, Zyklenzahl und Magnesiumionenkonzentration erfolgte in mehreren Schritten. Als theoretische Basis dienten die Arbeiten von Takeda et al. (1993), Hayashi et al. (1994) und Losi et al. (1992). Die Versuchsreihe war so aufgebaut, dass die Variation der Temperatur in Schritten zu 2°C von 61°C bis 67°C, die Magnesiumionenkonzentration von 1 mM bis 2mM in Schritten zu 0,25 mM und die Zyklenzahl in Einer-Schritten von 28-32 Zyklen in allen möglichen Kombination miteinander durchgeführt wurden. Im Rahmen der Versuchsreihe wurde bei jeder PCR immer nur ein Parameter verändert, die anderen blieben unverändert. Daraus ergab sich folgender Reaktionsablauf: 3 min bei 80°C, 28, 30 oder 32 x (0,5 min bei 95°C + 1,5 min bei 61, 63, 65 oder 67°C), dann 1 min 72°C, 7 min 72°C und die Beendigung der Reaktion durch Abkühlen auf 4°C. Der Reaktionsansatz wurde nach dem in Tabelle 5 aufgeführtem Schema pipetiert.

Tabelle 5: Pippetierschema für die MASA-PCR mit Variation der Mg^{2+} -Konzentration.

Komponente	Bezeichnung	Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR Puffer sine $MgCl_2$		10X Puffer	5 μ l	1 x
Sense-Primer	SET 2 GT	25 mM	2 μ l	1 mM
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 μ l	1 mM
Kontrollprimer	β - Globin 5'	25 mM	0,2 μ l	0,1 mM
	β - Globin 3'	25 mM	0,2 μ l	0,1 mM
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 μ l	200 μ M
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	50 mM	variabel von 1,0 mM – 2,0 mM	
Polymerase	<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/ μ l	0,25 μ l	1,25 U/Ansatz
H ₂ O			ad 45 μ l	
Templet DNA aus Verdünnungsreihe		100 ng/ μ l	5 μ l	10 ng/ μ l
Gesamtvolumen			50 μ l	

2.2.4.2 Variation der eingesetzten dNTP-Konzentration

Um eine weitere Verbesserung der Sensivität und Spezifität zu erreichen wurde in einer weiteren Versuchsreihe die dNTP-Konzentration schrittweise verändert. Hierzu wurden die Endkonzentration von 50, 100 und 200 μ M dNTP in den Reaktionsansatz eingesetzt. Die Ansätze wurden wie in Tabelle 5 (s. 2.2.4.1) angegeben mit einer Magnesiumchlorid-Endkonzentration von 1,5 mM pipettiert. Die PCR-Bedingungen lauteten wie folgt: 3 min bei 80 °C für 30,31 oder 32 Zyklen x (0,5 min bei 95°C + 1,5 min bei 65°C + 1 min bei 72°C) anschließend 7 min bei 72°C und Abschluss der Reaktion durch Abkühlen auf 4°C.

2.2.4.3 Variation der eingesetzten DNA-Konzentration

Diese Versuchsreihe diente dazu, herauszufinden, mit welcher DNA-Konzentration die größtmögliche Sensitivität und Spezifität erzielt werden konnte. Dazu wurde der Reaktionsansatz wie in Tabelle 5 (s. 2.2.4.1) mit einer Magnesiumchlorid-Endkonzentration von 1,5 mM pipettiert. Folgende DNA-Konzentrationen wurden getestet: 1 ng/ μ l, 10 ng/ μ l und 40 ng/ μ l.

Der Ablauf der PCR entsprach den bisher optimierten Bedingungen und lautete wie folgt: 3 min bei 80 °C für 30,31 oder 32 Zyklen x (0,5 min bei 95°C + 1,5 min bei 65°C + 1 min bei 72°C) anschließend 7 min bei 72°C und Abschluss der Reaktion durch Abkühlen auf 4°C.

2.2.4.4 Betrachtung einer möglichen Störung der MASA-PCR durch die β -Globin Primer

Die Fragestellung in dieser Versuchsreihe war, ob die gewählte Konzentration an β -Globin-Primer die untere Nachweisgrenze der MASA-PCR beeinflusste. Hierzu wurde der Ansatz wie in Tabelle 5 (s. 2.2.4.1) ohne die β -Globin-Primer und mit einer Magnesiumchloridkonzentration von 1,5 mM pipettiert, und die Reaktion unter den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 3 min bei 80 °C für 30 Zyklen x (0,5 min bei 95°C + 1,5 min bei 65°C + 1 min bei 72°C) anschließend 7 min bei 72°C und Abschluss der Reaktion durch Abkühlen auf 4°C.

2.2.4.5 Einsatz unterschiedlicher DNA-Polymerasen

Die im folgenden dargestellte Untersuchungsreihe befasste sich mit der Frage, ob durch die Verwendung anderer thermostabiler DNA-Polymerasen als der *Taq*-Polymerase, die in den vorangegangenen Versuchen (s. 2.2.4.1 bis 2.2.4.4) als Standardpolymerase eingesetzt worden war, eine Verbesserung der unteren Nachweisgrenze (also eine höhere Sensitivität bei gleichzeitig erhaltener Spezifität) zu erzielen war. Die *Taq*-Polymerase der Firma Gibco (jetzt Invitrogen), die in den bisherigen Versuchen eingesetzt worden war, hat keine 3'- oder 5'-Exonukleaseaktivität. Sie besitzt daher keine Möglichkeit Synthesefehler, d.h. den Einbau nicht komplementärer Basen, zu korrigieren. Solche Synthesefehler treten bei der *Taq*-Polymerase mit einer Häufigkeit von 1:400 auf (Losi et al., 1992). Das Ampli-*Taq*-Polymerase-Stoffelfragment soll nach Literatur- (Chen und Zarbl, 1997) und Herstellerangaben (Perkin and Elmer) ein deutlich verringertes Basenmismatch erzeugen, und damit eine Verbesserung der Spezifität bewirken. Die Qia-*Taq*-Polymerase verspricht nach Herstellerangaben eine größere Variationsbreite der Annealingtemperatur sowie der Magnesiumchloridkonzentration, bei der eine spezifische Reaktion abläuft.

Für die Versuchsreihe wurde der in Tabelle 5 beschriebene PCR-Ansatz mit einer Magnesiumchloridkonzentration von 1,5 mM pipettiert. Dieser Ansatz galt für die *Taq*-Polymerase und das Ampli-*Taq*-Polymerase-Stoffelfragment. Für die Qia-*Taq*-Polymerase wurde zu dem Reaktionsansatz kein Magnesiumchlorid hinzugefügt, da in dem mitgelieferten Puffer bereits Magnesiumchlorid in einer Konzentration von 1,5 mM enthalten war. Die PCR-Bedingungen entsprachen den unter 2.2.4 genannten Grundbedingungen mit einer Annealingtemperatur von 65°C und einer variablen Zykluszahl von 29, 30 oder 31.

2.2.4.6 „Nested PCR“ („ineinandergeschachtelte PCR“)

Als weiterer Versuch, die untere Nachweisgrenze der MASA-PCR zu senken, sollte die so genannte „Nested PCR“ zum Einsatz kommen. Diese bestand aus zwei PCRs, wobei die zweite PCR auf der ersten PCR aufbaute.

So wurde im ersten Schritt eine PCR durchgeführt, bei der mittels geeigneter Primer, hier K1203 und K1204L (s. Tabelle 6), ein DNA-Fragment erzeugt und vervielfältigt wurde, welches Codon 12 und 13 des *K-ras*-Gens mit einschloss. Im zweiten Schritt wurde dann das Produkt aus der ersten Reaktion stark verdünnt als Templet eingesetzt. Der Vorteil, den man sich dabei zunutze macht, ist, dass die zu untersuchende DNA-Sequenz in hoher Konzentration in der zweiten Reaktion eingesetzt wurde. Die übrige DNA ist dann als Störfaktor der Reaktion nur noch in geringer Menge vorhanden.

Zuerst wurde eine Reaktion durchgeführt, bei der mittels der Primer K1203 und K1204L ein 286 bp langes DNA-Fragment erzeugt wurde. Hierbei kam eine spezielle Polymerase zum Einsatz, die *Pfu*-Polymerase der Firma Promega, die das Risiko von fehlerhaft eingebauten Basen deutlich reduzieren soll. Diese verbesserten Eigenschaften beruhen auf einer 3'-Exonukleaseaktivität, die fehlerhaft eingebaute Basen erkennt und wieder aus dem Oligonukleotid her austrennt. Die Reaktion lief nach folgenden Bedingungen ab: 3 min bei 80°C, 25 x (0,5 min bei 95°C, 1,5 min bei 62°C, 1 min bei 72°C), dann 7 min bei 72°C und abschließend Abkühlung auf 4°C. Der erste Reaktionsansatz der „Nested PCR“ wurde wie in Tabelle 7 beschrieben pipettiert.

Tabelle 6: Primer für den ersten Schritt der „Nested PCR“

Name	Sequenz	Position*
K1203 (Sense-Primer)	5'- GTA CTG GTG GAG TAT TTG ATA GT-3'	359-371
K1204L (Antisense-Primer)	5'-CTC ATG AAA ATG GTC AGA GAA ACC-3'	624-647

* bezogen auf Genbank-Accession-Nummer AF285779

Tabelle 7: Reaktionsansatz für den 1. Schritt einer „Nested PCR“

Komponente	Bezeichnung	Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Promega 10 X PCR Puffer incl. 20 mM MgSO₄			5 µl	Mg²⁺: 2 mM
Sense-Primer	K1203	25 mM	2 µl	1 mM
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 µl	1 mM
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Polymerase	<i>Pfu</i> - Polymerase	5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/Ansatz
H ₂ O			Ad 45 µl	
Templet DNA aus der Verdünnungsreihe		100 ng/µl	5 µl	10 ng/µl
Gesamtvolumen			50 µl	

Für den zweiten Schritt der Reaktion wurde der Reaktionsansatz mit dem darin enthaltenen, im ersten Schritt der „Nested PCR“ amplifizierten DNA-Fragment, in einer Verdünnung mit TE-Puffer von 1:10 als Templet benutzt. Pro Reaktion wurden 0,5 µl des verdünnten Reaktionsansatzes als Templet eingesetzt. Die Bedingungen, nach denen die Reaktion ablief, entsprachen den bisher optimierten Grundbedingungen, d.h. eine Annealingtemperatur von 65°C, Magnesiumchlorid-Endkonzentration von 1,5 mM bei Verwendung der Qia-*Taq*-Polymerase. Es wurde zunächst mit einer Zyklenzahl von 20 begonnen und dann jeweils um einen Zyklus für jede neue Reaktion gesteigert, bis die Reaktion falsch positive Signale zeigte. Der Reaktionsansatz wurde wie in Tabelle 8 beschrieben pipettiert.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für den 2. Schritt einer „Nested PCR“

Komponente	Bezeichnung	Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Qiagen 10 X PCR Puffer incl. 15 mM MgCl ₂			5 µl	Mg ²⁺ : 1,5 mM
Sense-Primer	Set 2 GT	25 mM	2 µl	1 mM
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 µl	1 mM
Kontrollprimer	β - Globin 5'	25 mM	0,2 µl	0,1 mM
	β - Globin 3'	25 mM	0,2 µl	0,1 mM
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Polymerase	Qia - <i>Taq</i>	5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/Ansatz
H ₂ O			Ad 49,5 µl	
Templet aus Nested-PCR Teil 1		Verdünnung 1:10	0,5 µl	
Gesamtvolumen			50 µl	

2.2.4.7 Übertragung der optimierten MASA-PCR-Bedingungen auf Verdünnungsreihen von Tumorzellen im Knochenmark

Die an seriellen Verdünnungsreihen aus SW 480-Tumorzellen im Blut erprobten und optimierten Bedingungen (s. 2.2.4.1 bis 2.2.4.5) wurden in der nächsten Versuchsreihe auf die seriellen Verdünnungsreihen aus SW 480-Tumorzellen in Knochenmarkaspirat übertragen. Diese Verdünnungsreihen wurden wie unter 2.2.1.3.2 beschrieben hergestellt. Die MASA-PCR Bedingungen wurden wie unter 2.2.4.9 beschrieben mit dem Primer SET 2 GT angewandt.

2.2.4.8 Optimierung der PCR-Bedingungen bei Verwendung weiterer MASA-Primer

In dieser Versuchsreihe sollten die Bedingungen für den Nachweis der übrigen Mutationen in Codon 12 und 13 des K-*ras*-Gens, ausgehend von den bisherigen Versuchen (s. 2.2.4.1 bis 2.2.4.7) und Ergebnissen (3.1.1 bis 3.1.8), optimiert werden. Hierzu stand eine weitere Tumorzelllinie, die Lungenkarzinomzelllinie A 594 mit einer Mutation an der ersten Stelle des Codon 12 von GGT (Wildtyp) zu AGT (Mutation) zur Verfügung. Bei den Mutationen, für die keine Zelllinie als Positivkontrolle zur Verfügung stand, wurden die optimalen MASA-PCR Bedingungen für die verwendeten Primer durch Ausschluss falsch positiver Nachweise anhand der vorhandenen Verdünnungsreihen erarbeitet.

Methodisch wurde so vorgegangen, dass von der Zelllinie A 594, wie unter 2.2.1.3.2 beschrieben, serielle Verdünnungsreihen angefertigt wurden. Um die optimalen Bedingungen herauszuarbeiten, wurde der in den vorhergehenden Punkten erarbeitete und unter 2.2.4.9 als Tabelle 9 aufgelisteten Reaktionsansatz pipettiert. Die eingesetzten Sense-Primer entsprachen den unter 2.2.4 in Tabelle 4 genannten. Für jeden einzelnen Sense-Primer wurden die PCR-Reaktionsbedingungen wie folgt variiert: Zyklenzahl von 29 bis 31 in Schritten zu einem Zyklus und die Annealingtemperatur in Schritten zu je 1°C von 65 bis 67°C. Diese Bedingungen wurden soweit verändert, bis falsch positive Signale auftraten.

Die daraus folgenden PCR-Bedingungen waren: 3 min bei 80°C, 29,30 oder 31 x (1,5 min für 65, 66 oder 67°C, 1min bei 72°C) anschließend 7 min bei 72°C und Beendigung der Reaktion durch Abkühlen auf 4°C.

2.2.4.9 Optimierte MASA-PCR Bedingungen

Aus den unter den Punkten 2.2.4.1 bis 2.2.4.8 beschriebenen Versuchen und den unter Punkten 3.1.1 bis 3.1.8 dargestellten Ergebnissen ergaben sich folgende optimierte MASA-PCR Bedingungen, mit dem in Tabelle 9 aufgeführten Reaktionsansatz, die für die Analyse der DNA der Tumor- und Knochenmarksproben (s. 2.2.1.1 und 2.2.1.2) angewandt wurden. Die optimale Annealingtemperatur betrug in allen MASA-PCRs 65°C. Die optimale Zykluszahl für die Knochenmarkproben betrug 31. Für die Analyse der Tumorproben wurde aufgrund der hohen Dichte an Tumorzellen in dem Gewebe eine Zykluszahl von 30 gewählt. Die einzige Ausnahme bildete die Verwendung des Primers Set 2 GC. Hier wurden aufgrund der Tatsache, dass es in den unter 2.2.4.8 beschriebenen Versuchen bei hoher Menge an Tumor-DNA zu falsch positiven Ergebnissen bei 30 Zyklen (s. 3.1.8) kam, die Zykluszahl auf 29 gesenkt. Als Sense-Primer wurden SET 1 TC, SET 1 TT, SET 1 TA, SET 2 GT, SET 2 GC, SET 2 GA und Set 3 TC verwendet. Die Sense-Primer SET 3 TA und SET 3 GA wurden aufgrund der unter 3.1.8 beschriebenen Ergebnisse nicht zur weiteren Analyse der Proben eingesetzt. Die Endkonzentrationen der Reaktionspartner gehen aus der Tabelle 9 hervor.

Die optimalen Reaktionsbedingungen waren wie folgt: 3 min bei 80°C für 29 oder 30 Zyklen bei der Tumor-DNA oder 31 Zyklen bei den Knochenmarkproben x (0,5 min bei 95°C + 1,5 min bei 65°C + 1 min bei 72°C) anschließend 7 min bei 72°C und Abschluss der Reaktion durch Abkühlen auf 4°C.

Tabelle 9: Reaktionsansatz der optimierten MASA-PCR-Bedingungen

Komponente	Bezeichnung	Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Qiagen 10 X PCR Puffer incl. 15 mM MgCl ₂			5 µl	Mg ²⁺ : 1,5 mM
Sense - Primer variabel		25 mM	2 µl	1 mM
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 µl	1 mM
Kontrollprimer	β - Globin 5'	25 mM	0,2 µl	0,1 mM
	β - Globin 3'	25 mM	0,2 µl	0,1 mM
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Polymerase	Qia - <i>Taq</i>	5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/ Ansatz
H ₂ O			Ad 45 µl	
DNA		100 ng/µl	5 µl	10 ng/µl
Gesamtvolumen			50 µl	

2.2.5 Multiplex-ASPCR

Die unter 2.2.4.9 aufgeführten Reaktionsbedingungen wurden auf die Multiplex-ASPCR, in der die für eine Mutation an der zweiten Stelle des Codons 12 spezifischen Primer Set 2 GT, GC und GA gleichzeitig eingesetzt wurden, übertragen. Der Reaktionsansatz mit den entsprechenden Reaktionspartnern ist der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Multiplex–Allel–Specific-PCR

Komponente	Bezeichnung	Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Qiagen 10 X PCR Puffer incl. 15 mM MgCl ₂			5 µl	Mg ²⁺ : 1,5 mM
Sense - Primer SET2	SET 2 GT	25 mM	2 µl	1 mM
	SET 2 GC	25 mM	2 µl	1 mM
	SET 2 GA	25 mM	2 µl	1 mM
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 µl	1 mM
Kontrollprimer	β - Globin 5'	25 mM	0,2 µl	0,1 mM
	β - Globin 3'	25 mM	0,2 µl	0,1 mM
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Polymerase	Qia - <i>Taq</i>	5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/Ansatz
H ₂ O			Ad 45 µl	
Templet DNA aus der Verdünnungsreihe		100ng/µl	5µl	10ng/µl
Gesamtvolumen			50µl	

2.2.6 Sequenzierung

Um den Beweis führen zu können, dass ein positives Signal in der MASA-PCR tatsächlich das Vorhandensein einer Mutation widerspiegelte, kam ein weiteres Nachweisverfahren, die DNA-Sequenzierung, zum Einsatz.

Das Prinzip der DNA-Sequenzierung besteht darin, dass man zu dem Reaktionsansatz der sogenannten Kettenabbruch-PCR in geringen Mengen Didesoxynucleosidtriphosphat (ddNTP) dazugibt (Sanger et al., 1977). Werden die ddNTP dann in einer PCR in den DNA–Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Elongation, dem Kettenabbruch. Die dabei entstehenden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge können dann in einer hochauflösenden Gelelektrophorese aufgetrennt werden, so dass die genaue DNA-Sequenz ermittelt werden kann.

Die Sequenzierung in unserer Untersuchung lief in mehreren Teilschritten ab. Für die dazu notwendigen Reaktionen wurden die Primer von der Firma MWG Biotech Europe synthetisiert. Die Bedingungen für die Sequenzierung sowie die Auswahl der Primer sind an das Sequenzierungsprotokoll aus dem Sequenzierungshandbuch der Firma MWG Biotech Europe angelehnt. Zur Bereitstellung des Templates für die Sequenzierung wurde in einer PCR (hier genannt Cycle 1) mit den Primern K 1203 und K1204L (s. Tabelle 6) ein 286 bp-langes PCR-Produkt erstellt. Das erstellte DNA-Fragment schloss Codon 12 und 13 ein. Die Konzentrationen der einzelnen Reaktionszusätze gehen aus der Tabelle 11 hervor. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: 3 min 80°C, 27 x (0,5 min 95°C + 1,5 min 62°C + 1min 72°C) und anschließend 7 min 72°C mit abschließender Beendigung der Reaktion durch Abkühlung auf 4°C.

Tabelle 11: Reaktionsansatz zur Vermehrung des Template für die Sequenzierung (Cycle 1)

Komponente	Bezeichnung	Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR Puffer sine MgCl ₂	10X Puffer		5 µl	1 x
Sense-Primer	K1203	25 mM	2 µl	1 mM
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 µl	1 mM
Nukleotid	dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	50 mM	1,5 µl	1,5 mM
Polymerase	<i>Taq</i> - Polymerase	5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/Ansatz
H ₂ O			ad 45 µl	
Templet DNA		100 ng/µl	5 µl	10 ng/µl
Gesamtvolumen			50 µl	

In dem ersten Schritt des „cycle-sequencing“, bei dem 0,5µl des PCR-Produktes aus der Reaktion Cycle 1 als Template eingesetzt wurde, kamen „getailte“ Primer zum Einsatz. Die Basensequenz der verwendeten Primer bestand aus der in Tabelle 6 aufgeführten Basensequenz, denen ein „Tail“ aus der Sequenz der Primer M13 uni bzw. M13 rev angehängt wurde (Messing, 1983). Bei dem verwendeten Sense-Primer (hier M13 rev K1203 genannt) waren die ersten 3 Basen des 5`-Endes von K1203 durch ein 18 Basen langes Oligonukleotid, den „Tail“ M13 rev, ersetzt worden. Beim Anti-Sense-Primer (hier M13 univ K1204L genannt) wurden am 5`Ende von K1204L 4 Basen entfernt und dafür ebenfalls ein definiertes Oligonukleotid von 18 Basen, der „Tail“ M13 univ, angefügt. Die Basensequenz der Primer M13 rev K1203 und M13 univ K1204L ist in der Tabelle 12

aufgeführt. Mit diesen Primern wurde für den ersten Schritt der Sequenzierung eine PCR mit dem in Tabelle 13 gezeigtem Reaktionsansatz durchgeführt.

Tabelle 12: Primer für den 1. Schritt der Sequenzierung

M13 rev K1203	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC CTG GTG GAG TAT TTG ATA GT – 3'
M13 univ K1204L	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGA AAA TGG TCA GAG AAA CC-3'

Tabelle 13: Reaktionsansatz für den 1. Schritt der Sequenzierung

Komponente	Bezeichnung	Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR Puffer sine MgCl ₂	10X Puffer		5 µl	
Sense - Primer	M13 rev K1203	25 mM	1 µl	0,5 mM
Antisense - Primer	M13 univ K1204L	25 mM	1 µl	0,5 mM
Nukleotid	dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	50 mM	1,5 µl	1,5 mM
Polymerase	<i>Taq</i> - Polymerase	5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/Ansatz
H ₂ O			ad 49,5 µl	
Templet DNA aus PCR Cycle 1		unbekannt	0,5 µl	
Gesamtvolumen			50 µl	

Die Reaktionsbedingungen für das „cycle-sequencing“ lauteten wie folgt: 3 min 80°C, 3x (0,5 min 95°C + 1,5 min 62°C + 1 min 72°C) und 12x (0,5 min 95°C + 1,5 min 70°C) und anschließend 7 min 72 °C. Der Abschluss der Reaktion erfolgte durch Abkühlung auf 4°C.

In dem zweiten Schritt der Sequenzierung kam es zur Kettenabbruchreaktion, die im weiteren Verlauf die genaue Identifizierung der Basensequenz im Sequenziergel möglich machte. Für die Reaktion wurde der Primer M13 reverse 29 (s. Tabelle 14) eingesetzt, der in seiner Basenabfolge dem „Tail“ des Primer M13 rev. K 1203, also M13 rev, entspricht, und an seinem 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Marker IRD-500 gekennzeichnet war. Diese fluoreszierende Markierung dient dazu in der späteren, lasergestützten Analyse die geringe Anzahl an entstehenden DNA- Fragmenten nachweisen zu können.

In der Kettenabbruchreaktion wurde als Templet 0,5µl des Produktes aus der vorhergehenden PCR, dem ersten Schritt der Sequenzierung, eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit DMSO, dem Primer, dem DNA-Templet und H₂O entsprechend der Tabelle 15 zusammengefügt, und dann in 4 Teile aliquotiert. Diesen Aliquots wurde jeweils einer der vier möglichen ddNTP (je 1µl A Reagenz, C Reagenz, G Reagenz oder T

Reagenz, s. 2.1.9) sowie 1 µl Thermosequenase zugefügt. Anschließend lief die Reaktion wie folgt ab: 1 min und 45 s 95°C, dann 12 x (15 s 95°C + 15 s 55°C + 15 s 70°C), dann 13x (20 s 95°C + 20 s 55°C + 20 s 70°C), anschließend 40 s 95°C und abschließend Beendigung der Reaktion durch Abkühlen auf 4°C.

Tabelle 14: Fluoreszierend markierter Primer für die Kettenabbruchreaktion der Sequenzierung

M13 reverse 29	5' cag-gaa-aca-gct-atg-acc-3'
----------------	-------------------------------

Tabelle 15: Reaktionsansatz für die Kettenabbruchreaktion der Sequenzierung (Prämix)

Komponente	Bezeichnung	Stammkonzentration	Volumen
Primer	M13 reverse 29	25 mM	1 µl
DMSO			0,5 µl
Templet DNA aus vorausgehender PCR		unbekannt	0,5 µl
H ₂ O			11 µl
Gesamtvolumen			13 µl

Nach Abschluss der Reaktion wurden zu jedem Reaktionsansatz 3 µl Stop-/Loading-Puffer (s. 2.1.5) gegeben. Anschließend wurde je 1 µl des Gemisches in die Taschen des Sequenziergels (Gelzusammensetzung siehe 2.1.6) aufgetragen. Dieses lief bei einer Spannung von 1500 V bei einer Temperatur von 50°C über 3-4 h in einem DNA-Sequenzierungsgerät der Firma MWG-Biotech (s. 2.1.2).

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programmes Base Image IR Data Collection Version 2.31 (Li-Cor, Nebraska, USA, 1992-95) aufgezeichnet und gespeichert und anschließend mit dem Analyseprogramm Base Image IR Image Analysis, Version 4.0 (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA, 1997) ausgewertet.

2.2.7 Temporal Temperature Gradient Elektrophoresis (TTGE)

Bei der „Temporal Temperature Gradient Elektrophoresis“ (Andersen und Borresen, 1995) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem man sich mehrere Eigenschaften der DNA im elektrischen Feld zunutze macht. Zum ersten die Tatsache, dass die DNA-Fragmente sich aufgrund ihrer Ladung und Länge unterschiedlich schnell in einem geeigneten Medium

bewegen. Daraus resultiert die unterschiedliche Strecke der Wanderung, die sich dann in einer Gelanalyse sichtbar machen lässt. Weiterhin kommt es in einem denaturierenden Gel zu unterschiedlichen Denaturierungsgraden der DNA, so dass schon Punktmutationen zu unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten führen.

Bei der „Temporal Temperature Gradient Elektrophoresis“ kommt ein Polyacrylamidgel (s. 2.1.6) mit den entsprechenden benötigten Puffern (s. 2.1.5) zur Anwendung.

Zur Analyse der Proben wurde zuerst eine PCR, genannt Cycle 1 (s. 2.2.6), mit den Primern K 1203 und K 1204L zur Bereitstellung eines DNA-Fragmentes, das Codon 12 und 13 einschloss, durchgeführt. Von diesem PCR-Produkt wurden 5 µl mit 1 µl Schwerelösung (s. 2.1.5) in die Tasche des Polyacrylamidgels (s. 2.1.6) aufgetragen. Das Gel befand sich in der speziellen Laufkammer (2.1.2) und in dem entsprechenden Laufpuffer (s. 2.1.5). Anschließend lief das Gel unter folgenden Bedingungen: Anfangstemperatur 53°C, Steigerung auf die Endtemperatur von 63°C mit einer kontinuierlichen Heizrate von 2°C/h. Daher betrug die Laufzeit 5h bei einer angelegten Spannung von 160 V.

Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer Denaturierung der in der PCR entstandenen verschiedenen Hybride und damit verbunden einer, aufgrund der unterschiedlichen Laufstrecken, sichtbaren Auftrennung im Gel. Bei ausschließlich homozygot vorliegender DNA, d.h. Wildtyp/Wildtyp (Homoduplex) oder Mutation/Mutation (Homoduplex) zeigt sich im TTGE-Gel nur eine sichtbare Bande. Bei heterozygoter DNA (aus Wildtyp und Tumor) liegt ein Gemisch der Hybride Wildtyp/Wildtyp (Homoduplex), Mutation/Mutation (Homoduplex), Mutation/Wildtyp (Heteroduplex) und Wildtyp/Mutation (Heteroduplex) vor, das sich als vier Banden im Gel auftrennen lässt.

Die entstandenen Hybride ließen sich durch eine Silberfärbung nach Rosenbaum und Riesner (1987), modifiziert nach Menke et al. (1995) sichtbar machen. Hierzu lief die Färbung wie folgt, in den unter 2.1.5 genannten Lösungen, ab: Fixierung in einer Fixierlösung 3 mal 5 min, Silberimprägnierung für 15 min in einer Silbernitratlösung, Differenzierung durch 2 mal 2 s spülen mit H₂O, Entwicklung in einer Entwicklerlösung für 1 mal 3 min, 1 mal 5 min und 1 mal 12 min und Nachentwicklung für 5 min. in einer Nachentwicklerlösung. Danach wurde das Polyacrylamidgel (s. 2.1.6) gut mit Wasser gewaschen und in Folie eingeschweißt. Anschließend konnten die Banden mit Hilfe eines Scanners (s. 2.1.2) dokumentiert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung der MASA-PCR-Bedingungen

In den Punkten 3.1.1 bis 3.1.9 werden die Ergebnisse zur Optimierung der MASA-PCR-Bedingungen (unter 2.2.4.1 bis 2.2.4.9 beschrieben) erläutert. Die Optimierungen (s. 2.2.4.1 bis 2.2.4.7) wurden mit dem Sense-Primer SET 2 GT (s. 2.2.4, Tab. 4) durchgeführt. Auf den im folgenden gezeigten Agarose Gelen wurden die PCR-Produkte, wenn nicht anders beschrieben, wie folgt aufgetragen: XIII: Molekularer DNA-Längenstandard XIII, 1: SW 480-Zellen, 2: Blut eines tumorfreien Probanden, 3: 10^5 SW 480-Zellen auf 1 ml Blut, 4: 10^4 SW 480-Zellen auf 1 ml Blut, 5: 10^3 SW 480-Zellen auf 1 ml Blut, 6: 10^2 SW 480-Zellen auf 1 ml Blut, 7: 10^1 SW 480-Zellen auf 1 ml Blut, 8: 10^0 SW 480-Zellen auf 1 ml Blut, 9: 10^{-1} SW 480-Zellen auf 1 ml Blut, 10: TE-Puffer, XIII: Molekularer DNA-Längenstandard XIII.

Die MASA-PCR-Bedingungen wurden anhand DNA der seriellen Verdünnungsreihen (s. 2.2.1.3.2) optimiert. Die Ergebnisse der Optimierung wurden bewertet, indem die in der Agarose-Gelelektrophorese sichtbaren Banden einer Länge von 178 bp (K-ras-spezifische Bande bei Verwendung des Primer Set 2 GT) einer bestimmten Verdünnungsstufe (10^5 - 10^{-1} Tumorzellen auf 1ml Blut) zuzuordnen waren. Banden von 178 bp Länge bei dem PCR-Produkt aus dem Blut tumorfreier Probanden wurden immer als falsch positiver Nachweis für eine Mutation gewertet.

3.1.1 Variation der Annealingtemperatur, Zyklenzahl und Magnesiumionen-konzentration

In den Versuchsreihen (s. 2.2.4.1) zeigte sich bei sinkender Temperatur, Erhöhung der Zykluszahl und steigender Konzentration an Magnesiumchlorid im Reaktionsansatz eine Zunahme an falsch positiven Ergebnissen, was eine Abnahme der Spezifität bedeutete. Bei steigender Temperatur, Erniedrigung der Zykluszahl und Erniedrigung der Konzentration an Magnesiumchlorid im Reaktionsansatz erhöhte sich die Nachweisgrenze und damit sank die Sensitivität dieses Verfahrens. In den Abbildungen 3-5 sind die beschriebenen Auswirkungen exemplarisch für die Versuchsreihe, in der die $MgCl_2$ -Konzentrationen

systematisch von 1 mM bis 2 mM in 0,25 mM-Schritten variiert wurden, dargestellt. Eine Magnesiumchloridkonzentration von 1,5 mM erwies sich als die optimale Konzentration. Mit dieser konnte in der MASA-PCR mit 30 Zyklen und einer Annealingtemperatur von 65°C eine untere Nachweisgrenze von 10³-SW 480-Zellen auf 1ml Blut erreicht werden (s. Abb. 3, Spur 5). Auf der Abbildung 3 zeigt sich bei einer MASA-PCR mit einer Magnesiumchloridkonzentration von 1,5 mM aus der DNA aller Verdünnungsstufen, dem Blut eines Tumorfreen Probanden und der SW 480-Zellen eine β -Globinbande von 286 bp Länge als Nachweis einer korrekt abgelaufenen Reaktion (Abb. 3-5, Spur 1-9). Die Bande, die eine K-*ras* Mutation anzeigt, ist in Abbildung 3 bis zu einer Verdünnungsstufe von 10³-SW 480 Zellen auf 1 ml Blut (Spur 5) sicher zu erkennen, ohne dass unspezifische Banden bei der DNA des tumorfreen Probanden (Spur 2) sichtbar waren. Bei einer niedrigeren Magnesiumchloridkonzentration, in Abbildung 4 für 1,25 mM dargestellt, zeigt sich ein Mutationsnachweis bis zu einer Verdünnung von 10⁴-SW 480 Zellen auf 1 ml Blut (Spur 4). Bei dieser Magnesiumchloridkonzentration findet sich keine unspezifische Bande bei der DNA tumorfreier Probanden (Spur 2). Bei einer Steigerung der Magnesiumchloridkonzentration, in Abbildung 5 für 1,75 mM dargestellt, zeigte sich eine unspezifische Bande bei der DNA der tumorfreien Probanden (Spur 2).

Die erreichte untere Nachweisgrenze lag somit bei 10³ Tumorzellen auf 1 ml Blut mit einer Magnesiumchloridkonzentration von 1,5 mM, einer Annealingtemperatur von 65°C und einer Zykluszahl von 30 (s. Abb. 3).

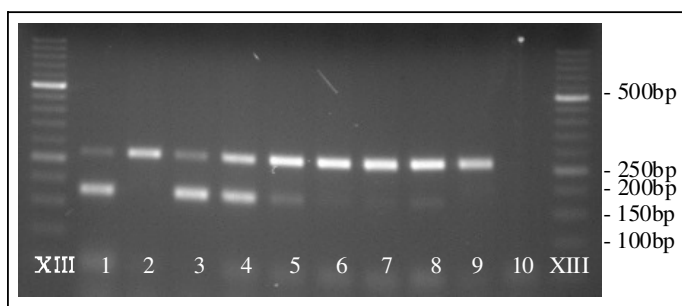


Abbildung 3: Agarose-Gelelektrophorese der MASA-PCR einer seriellen Verdünnungsreihe aus SW-480 Zellen und Blut tumorfreier Probanden, Proben aufgetragen wie unter 3.1 beschrieben, mit 30 Zyklen, 65°C Annealingtemperatur und 1,5 mM MgCl₂. Nachweis der K-*ras* Mutation bis zu einer Verdünnung von 10³–SW 480–Zellen auf einen Milliliter Blut (s. Spur 5).

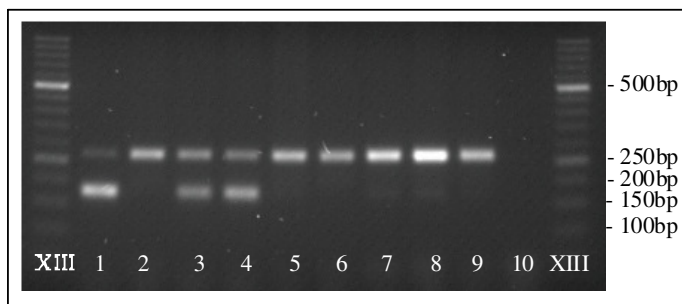


Abbildung 4: Agarose-Gelelektrophorese der MASA-PCR einer seriellen Verdünnungsreihe aus SW-480 Zellen in Blut eines tumorfreien Probanden; Proben aufgetragen wie unter 3.1 beschrieben, mit 30 Zyklen, 65°C Annealingtemperatur, 1,25 mM MgCl₂. Nachweis der K-ras Mutation bis zu einer Verdünnung von 10⁴-SW 480-Zellen auf einen Milliliter Blut (s. Spur 4).

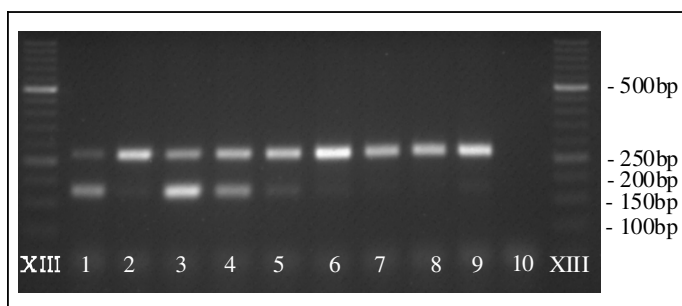


Abbildung 5: Agarose-Gelelektrophorese der MASA-PCR einer seriellen Verdünnungsreihe aus SW-480 Zellen und Blut tumorfreier Probanden, Proben aufgetragen wie unter 3.1 beschrieben mit 30 Zyklen, 65°C Annealingtemperatur und 1,75 mM MgCl₂. Bereits unspezifisches Signal bei Blut von tumorfreien Probanden (s. Spur 2).

3.1.2 Variation der eingesetzten dNTP-Menge

In dieser Versuchsreihe (s. 2.2.4.2) wurde der Einfluß der eingesetzten dNTP-Menge auf die untere Nachweisgrenze überprüft. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der dNTP-Konzentration von 100 auf 200 µM im Reaktionsansatz keine signifikante Steigerung der Sensitivität erbrachte. In der Agarose Gelelektrophorese waren bei einer dNTP-Konzentration von 200 µM die Banden, insbesondere die β-Globinbande, am deutlichsten. Bei einer Reduzierung der dNTP-Konzentration auf 50 µM im Reaktionsansatz war eine Erhöhung der Zyklenzahl auf 31 notwendig, um die untere Nachweisgrenze von 10³-Tumorzellen auf 1 ml Blut (vgl. 3.1.1) und damit ein vergleichbares Ergebnis wie bei einer dNTP-Konzentration von 200 µM zu erzielen. Erhöhungen der Zykluszahlen führten zu falsch positiven Ergebnissen (keine Abbildung).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf der Untersuchung eine dNTP-Endkonzentration von 200 μ M im Reaktionsansatz der MASA-PCR gewählt.

3.1.3 Variation der eingesetzten DNA-Menge

Diese Versuchsreihe (s. 2.2.4.3) beschäftigte sich mit der Frage, ob eine Veränderung der DNA-Konzentration im Reaktionsansatz eine Veränderung der Sensitivität und der Spezifität verursacht. Bei einer DNA-Konzentration von 10 ng/ μ l ließen sich die Ergebnisse mit einer unteren Nachweisgrenze von 10^3 Tumorzellen auf 1 ml Blut bei einer Zyklenzahl von 30 sicher reproduzieren. Die Reduktion der DNA-Konzentration auf 1 ng/ μ l hatte zur Folge, dass selbst bei einer Erhöhung der Zyklenzahl nur eine untere Nachweisgrenze von 10^4 Tumorzellen auf 1 ml Blut erzielt werden konnte. Eine Erhöhung der Konzentration auf 40 ng/ μ l erbrachte auch bei Reduzierung der Zyklen falsch positive Reaktionen, die sich durch eine Bande im Agarose-Gel bei der tumorfreien Blutprobe äußerte (ohne Abbildung).

3.1.4 Betrachtung einer möglichen Störung der MASA-PCR durch die β -Globin Primer

Die Frage, ob die MASA-PCR durch das Vorhandensein der β -Globin Primer gestört wird, wurde in einer Versuchsreihe geklärt, bei der ein Reaktionsansatz ohne β -Globin Primer erstellt wurde (s. 2.2.4.4). In der Agarose-Gelelektrophorese (s. Abbildung 6) zeigten sich die Banden, die das Vorhandensein einer *K-ras* Mutation anzeigen, mit einer unteren Nachweisgrenze von 10^3 Tumorzellen auf 1 ml Blut (Abb. 6, Spur 5). Lediglich die Banden des 286 bp langen β -Globin-DNA-Fragments fehlen. Da dieses Ergebnis identisch ist zu dem der MASA-PCR mit β -Globin-Primern (s. 3.1.1) kann geschlossen werden, dass die Anwesenheit der β -Globin-Primer in der Endkonzentration von 0,1 mM keinen Einfluss auf die untere Nachweisgrenze hat.

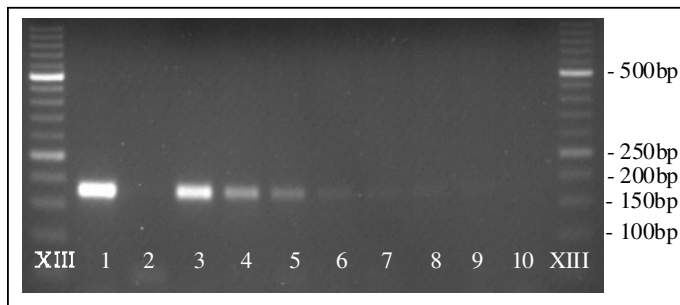


Abbildung 6: Gelelektrophorese der MASA-PCR einer Verdünnungsreihe ohne β -Globin-Primer, Proben aufgetragen wie unter 3.1 beschrieben, mit 30 Zyklen, 65°C Annealingtemperatur und 1,5 mM $MgCl_2$. Nachweis der *K-ras* Mutation bis zu einer Verdünnung von 10^3 -SW 480-Zellen auf einen Milliliter Blut (s. Spur 5).

3.1.5 Einsatz unterschiedlicher Polymerasen

Es sollte die Frage geklärt werden, ob die durch die *Taq*-Polymerase (Gibco/Invitrogen) erzielte untere Nachweisgrenze von 10^3 Tumorzellen auf 1 ml Blut (s. 3.1.1 bis 3.1.4) bei Einsatz anderer Polymerasen noch weiter gesenkt werden konnte (s. 2.2.4.5). Dabei zeigte sich, dass durch Verwendung der *Qia-Taq*-Polymerase mit dem für diese Polymerase im Kit mitgelieferten und auf diese abgestimmten Puffer die untere Nachweisgrenze auf 10^2 Tumorzellen in 1 ml Blut (s. Abb. 7, Spur 6) gesenkt werden konnte. Die Zyklenzahl ließ sich auf 31 steigern, ohne dass falsch positive Ergebnisse (s. Abb. 7, Spur 2) auftraten, wie es bei den beiden anderen getesteten Polymerasen, der *Taq*-Polymerase und der *Ampli-Taq*-Polymerase, der Fall war. Des Weiteren wurde bei der Verwendung der *Qia-Taq*-Polymerase eine deutlich verbesserte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht. Die schwachen Signale bei den Verdünnungsstufen 10^1 - 10^{-1} in der Agarose Gelelektrophorese (s. Abb. 7, Spur 7-9) wurden nicht als positive Nachweise für eine *K-ras* Mutation gewertet.

Im Vergleich der *Ampli-Taq*-Polymerase (Stoffelfragment) zur *Taq*-Polymerase zeigte sich kein signifikanter Vorteil hinsichtlich einer Verbesserung der unteren Nachweisgrenze (ohne Abbildung).

Aus der unteren Nachweisgrenze von 10^2 Tumorzellen auf 1 ml Blut und einer durchschnittlichen Anzahl von 3400 kerntragenden Zellen pro μ l Blut (s. 2.2.1.3.2) ergibt sich eine Nachweisgrenze von 1 Tumorzelle auf $3,4 \times 10^4$ kerntragenden Zellen.

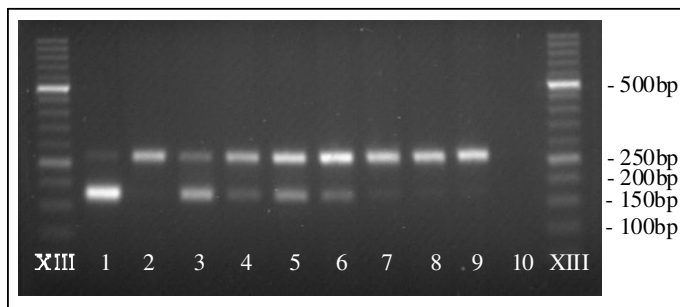


Abbildung 7: Agarose Gelelektrophorese der MASA-PCR einer Verdünnungsreihe, Proben aufgetragen wie unter 3.1 beschrieben mit 31 Zyklen, 65°C Annealingtemperatur und Qia-Taq-Polymerase mit dazugehörigem Puffer. Nachweis einer *K-ras* Mutation bis zu einer Verdünnung von 10^2 Tumorzellen in einem Milliliter Blut (Spur 6), keine unspezifische Bande bei der DNA tumorfreier Probanden (Spur 2).

3.1.6 „Nested PCR“

Auch mit Hilfe der „Nested PCR“ konnte die bisher erreichte untere Nachweisgrenze nicht weiter gesenkt werden (ohne Abbildung). So wurde mit ihr eine sicher zu reproduzierende Nachweisgrenze von 10^3 Tumorzellen auf 1 ml Blut erzielt. Diese Nachweisgrenze ließ sich bei den unter 2.2.4.6 genannten Bedingungen mit einer Zyklenzahlen von 22 in der zweiten PCR zeigen. Bei Reduzierung der Zyklenzahl verschlechterte sich die untere Nachweisgrenze. Bei Erhöhung der Zyklenzahl kam es zu falsch positiven Ergebnissen.

3.1.7 Übertragung der optimierten MASA-PCR-Bedingungen auf Verdünnungsreihen von Tumorzellen im Knochenmark

Die bisher an Verdünnungsreihen aus SW 480-Tumorzellen in Blut optimierten MASA-PCR-Reaktionsbedingungen (s. 2.2.4.9) wurden in der folgenden Versuchsreihe (s. 2.2.4.7) auf Verdünnungsreihen aus Tumorzellen in Knochenmarkaspiraten (s. 2.2.1.3.2) übertragen. Dabei ergab sich auch hier eine untere Nachweisgrenze von 10^2 Tumorzellen pro ml (ohne Abbildung).

3.1.8 Übertragung der mit ausgewählten Primern optimierten Bedingungen auf die übrigen Primer

Die bisher durchgeführten Optimierungen zur MASA-PCR (s. 2.2.4.1 bis 2.2.4.7) wurden ausschließlich mit dem Primer SET 2GT und den seriellen Verdünnungsreihen von SW 480-Kolonkarzinomzellen in Blut oder Knochenmark durchgeführt. In dieser Versuchsreihe (s. 2.2.4.8) sollte mit Hilfe einer weiteren Zelllinie, der Lungenkarzinom-Zelllinie A 594 (s. 2.1.7) und den daraus erstellten seriellen Verdünnungsreihen die optimalen MASA-PCR-Bedingungen für die weiteren Primer (s. 2.2.4, Tab. 4) erarbeitet werden.

Die Verdünnungsreihen der A 594-Zellen in Blut wurden benutzt, um zu überprüfen, bei welchen PCR-Bedingungen die optimale untere Nachweisgrenze für den Primer SET 1 TA erzielt werden konnte. Dabei zeigte sich in der MASA-PCR mit Primer SET 1 TA für die *K-ras* Mutation von GGT zu AGT in Codon 12, welche der Mutation der Zelllinie A 594 entspricht, eine untere Nachweisgrenze von 10^2 Tumorzellen auf 1 ml Blut bei den optimalen Bedingungen, die auch für die SW 480-Zellen galten (s. 2.2.4.9). Zur weiteren Überprüfung der Spezifität der optimierten MASA-PCR-Bedingungen wurden PCRs mit dem Primer SET 2 GT (spezifisch für die Mutation der SW 480 Zelllinie) mit der Zelllinie A 594 und dem Primer SET 1TA (spezifisch für die Mutation der A 594 Zelllinie) mit der Zelllinie SW 480 durchgeführt. Unter den optimalen PCR-Bedingungen erbrachten diese Reaktionen in der Agarose-Gelelektrophorese keine falsch positiven Signale.

Bei den PCRs mit den Primern SET 1 TC und TT, SET2 GA und SET 3 TC, für die keine geeignete Tumorzelllinie vorlag, ließen sich unter den optimalen PCR-Bedingungen und mit den seriellen Verdünnungsreihen beider Tumorzelllinien keine falsch positiven Ereignisse erzeugen. Auch eine weitere Steigerung der Zyklenzahl oder Absenkung der Annealingtemperatur erbrachte keine falsch positiven Ergebnisse. Der Primer Set 2 GC zeigte bei einer Annealingtemperatur von 65°C und bei 30 Zyklen ein schwach positives Signal bei der reinen DNA aus SW 480-Tumorzellen. Bei der DNA in der Verdünnung von 10^6 SW 480-Tumorzellen auf 1 ml Blut war allerdings kein falsch positives Ergebnis sichtbar. Ebenso war auch nach Reduktion der Zyklenzahl auf 29 bei Einsatz der reinen SW 480-DNA als Templet keine *K-ras*-spezifische Bande in der Agarose-Gelelektrophorese erkennbar.

Die Primer Set 3 TA und SET 3 GA lieferten unter allen genannten Veränderungen der PCR-Bedingungen durchgehend falsch positive Ergebnisse für beide Tumorzelllinien.

3.1.9 Ergebnisse der Multiplex-ASPCR

Die Multiplex-ASPCR (s. 2.2.5) wurde unter den optimierten MASA-PCR-Bedingungen (s. 2.2.4.9) durchgeführt. Sie diente dazu, durch Kombination von Primern (s. 1.3.1) die Anzahl an MASA-PCRs zu reduzieren. Zu Beginn der Versuchsreihe lief die Multiplex-ASPCR mit 31 Zyklen ab. Unter diesen Reaktionsbedingungen zeigten sich bei Einsatz des Primer SET 2 aber durchgehend falsch positive Signale in der Agarose-Gelelektrophorese. Daher wurde die Zahl der Zyklen im weiteren Verlauf der Versuchsreihe systematisch um jeweils einen Zyklus reduziert. Trotz einer Reduktion der Zykluszahl auf 28 traten weiterhin falsch positive Signale in der Agarose-Gelelektrophorese bei dem Blut tumorfreier Probanden und in der Verdünnungsstufe von 10^{-1} erkennbar auf. Da auch bei 28 Zyklen keine ausreichende Spezifität der Methode erzielt werden konnte, wurde die Multiplex-ASPCR nicht zur Analyse der zu untersuchenden Proben eingesetzt.

3.2 Nachweis von K-ras Mutationen im Frischtumorgewebe, im paraffingebetteten Tumorgewebe und im Knochenmark der Tumor-Patienten- und der Patienten-Kontrollgruppe mittels der MASA-PCR

Die MASA-PCRs in den unter 3.2.1 bis 3.2.4 beschriebenen Untersuchungsreihen liefen alle nach den optimierten PCR-Bedingungen (s. 2.2.4.9) ab. Zur Detektion einer K-ras Mutation kamen die sieben Primer (SET 1TC, SET1 TT, SET 1 TA, SET 2 GT, SET 2 GC, SET 2 GA und Set 3 TC) zum Einsatz mit denen im Rahmen der Optimierung (s. 3.1.8) eine hohe Sensivität und Spezifität erreicht werden konnte. Die Untersuchungsergebnisse wurden für alle dargestellten Versuchsreihen bei denen die MASA-PCR zum Einsatz kam jeweils dreimal reproduziert, um einmalige falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können.

Die Ergebnisse der Versuche (3.2.1 bis 3.2.3) sind im Anhang als Tabelle 16 detailliert aufgeführt.

Von dem unter 3.2.1 und 3.2.2 untersuchten Tumorgewebe wurden HE-Schnitte angefertigt um zu zeigen, dass es sich sicher und um ausreichend Tumorgewebe handelte.

3.2.1 K-ras Mutationen im frischen Tumorgewebe

Die Gewebeproben der Patienten wurden wie unter 2.2.1.2, 2.2.2.1, 2.2.3.1 und 2.2.3.1 beschrieben gewonnen, aufgearbeitet und aufbewahrt. Insgesamt floss Frischtumorgewebe von 36 Patienten in die Analyse ein. Das frische Tumorgewebe wurde mit Hilfe der MASA-PCR auf die sieben oben genannten Mutationen hin untersucht. Bei 10 dieser 36 Frischtumorproben konnte eine Mutation nachgewiesen werden, wobei es sich ausschließlich um Mutationen an der 2. Base des Codon 12 handelte. Bei den detektierten Mutationen fand sich viermal die Mutation von GGT zu GTT und sechsmal von GGT zu GAT. In Abbildung 8 ist exemplarisch eine MASA-PCR mit dem Primer SET 2 GA dargestellt. Man erkennt in Spur 1-9 die kräftige 286 bp lange β -Globinbande. In den Spuren 1, 2, 5, 6 und 9 erkennt man jeweils eine schwächere Bande einer Länge von 178 bp. Hierbei handelte es sich um den Nachweis von K-ras Mutationen von GGT zu GAT bei den Proben C 40 (Spur 1), C 89 (Spur 2), C 64 (Spur 5), C 93 (Spur 6) und C 98 (Spur 9). In der letzten Spur wurde TE-Puffer als Negativkontrolle in die Reaktion mit eingesetzt.

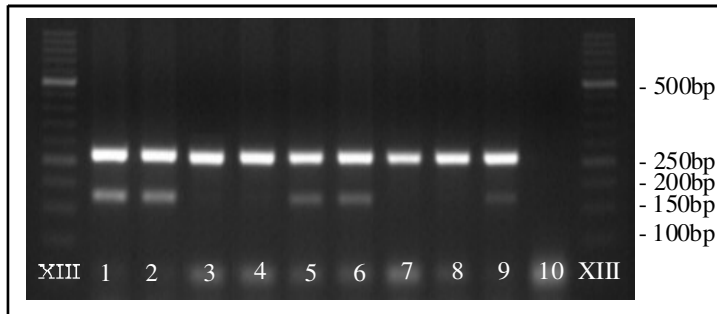


Abbildung 8: MASA-PCR Analyse mit dem Primer SET 2 GA aus Frischtumorgewebe (XIII: Längenstandard, 1: C40, 2: C 89, 3: C60, 4: C61, 5: C64, 6: C93, 7: C32, 8: C92, 9: C98, 10: TE-Puffer, XIII: Längenstandard)

3.2.2 K-ras Mutationen im paraffineingebetteten Tumorgewebe

Die paraffineingebetteten Tumorgewebeproben wurden wie unter 2.2.1.2 dargestellt gewonnen und die DNA für die weiteren Versuche wurde wie unter 2.2.2.3, 2.2.3.3 beschrieben extrahiert und kontrolliert. Insgesamt konnte von 39 Patienten Material aus den paraffineingebetteten Tumorgewebeproben gewonnen und mittels der MASA-PCR auf die unter 3.2 genannten sieben Mutationen hin untersucht werden. Davon zeigten 12 der

analysierten Proben eine Mutation im *K-ras*-Gen. Hierbei handelte es sich um eine Mutation an der 1. Stelle des Codon 12 von GGT zu TGT und 11 Mutationen an der 2. Stelle des Codon 12, davon fünfmal GGT zu GTT und sechsmal GGT zu GAT. Die Gelelektrophorese einer MASA-PCR mit dem Primer SET 2 GT zum Nachweis einer Mutation von GGT zu GTT ist in Abbildung 9 exemplarisch dargestellt. In Abbildung 9 erkennt man erneut die 286 bp lange β -Globinbande (Spur 1-9) als Ausdruck einer korrekt abgelaufenen PCR. Die Proben C65 (Spur 7), C 10 (Spur 8) und C 23 (Spur 9) zeigen eine *K-ras* Mutation, welche sich als Bande in der Agarose-Gelelektrophorese darstellt. Bei den weiteren aufgetragenen Proben C15, C26, C86, C80, C37 und C 88 ließ sich keine Mutation nachweisen.

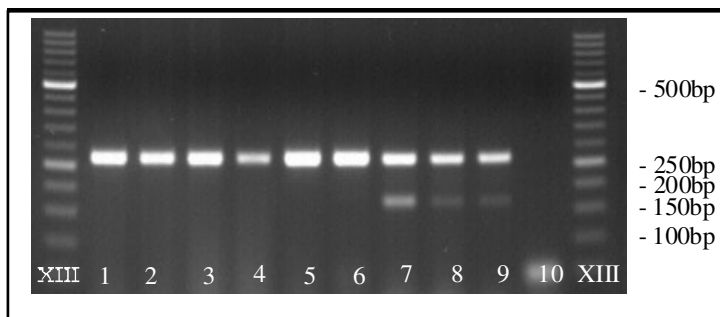


Abbildung 9: MASA-PCR Analyse mit dem Primer SET 2 GT aus paraffingebetteten Tumorgewebe (XIII: Längenstandard, 1: C15, 2: C 26, 3: C68, 4: C80, 5: C37, 6: C88, 7: C65, 8: C10, 9: C 23, 10: TE-Puffer, XIII: Längenstandard)

3.2.3 K-ras Mutationen im Knochenmark in der Tumor-Patienten-Gruppe

Die Knochenmarksproben wurden wie unter 2.2.1.1, 2.2.2.1, 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben gesammelt, aufgearbeitet, kontrolliert und aufbewahrt. Untersucht wurden die Knochenmarkaspirate der 18 Patienten (s. 3.5), bei denen in der DNA aus dem Tumorgewebe (frisch und paraffingebettet) eine Mutation nachgewiesen worden war. Dabei wurde jeweils der MASA-Primer verwendet, durch dessen Einsatz die Mutation in der Tumor-DNA identifiziert worden war. Zusätzlich wurden 10 willkürlich ausgesuchte Proben von Patienten untersucht, in denen in der Untersuchung der Tumor-DNA keine *K-ras* Mutation detektiert worden war. Die Proben, bei denen bisher keine Mutation im Tumorgewebe nachgewiesen war, wurden auf die sieben unter 3.2 genannten Mutationen hin untersucht.

In 2 (C 26 und C 38) der 18 Knochenmarksproben, deren korrespondierendes Tumorgewebe Mutationen aufwies, wurde eine Mutation nachgewiesen. Dies entspricht einer Häufigkeit von 11 % bezogen auf die Gruppe der Patienten (n=18) mit einer *K-ras* Mutation im Tumorgewebe. Auf die Gesamtgruppe (n=62) übertragen, entspricht dies einer Nachweishäufigkeit von 3 %. Bei den identifizierten Mutationen, welche beide das Codon 12 betrafen, handelt es sich zum einen um eine Transversion von GGT zu GTT und zum anderen um eine Transition von GGT zu GAT. Mit der ermittelten unteren Nachweisgrenze (s. 3.1.5) entspricht dies einer Anzahl von mindestens 10^2 Tumorzellen auf 1 ml Knochenmarkaspirat. In der Abbildung 10 ist der Nachweis der Mutation von GGT zu GTT in der Knochenmarkspure C 38 exemplarisch dargestellt. In Spur 4 erkennt man eine dem amplifizierten *K-ras*-Fragment entsprechende Bande mit einer Länge von 178 bp im Agarose-Gel. Die Bande in Spur sieben entspricht der Positivkontrolle von 10^2 SW 480–Zellen auf 1 ml Knochenmark.

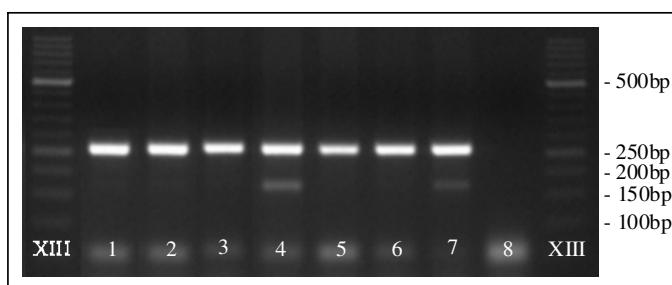


Abbildung 10: MASA-PCR Analyse der Knochenmarksproben (1: C10, 2: C23, 3: C33, 4: C38, 5: C51, 6: C65, 7: 10^2 SW480 Zellen: 1 ml Blut:, 8: TE-Puffer, XIII: Längenstandard)

In den zehn willkürlich ausgesuchten Knochenmarksproben wurde durch die MASA-PCR keine Mutation im *K-ras*-Gen detektiert.

3.2.4 K-ras Mutationen im Knochenmark in der Patienten-Kontrollgruppe

23 Patienten mit einem Bauchaortenaneurysma dienten als Kontrollgruppe. Die Untersuchungsbedingungen entsprachen denen der Versuchsgruppe. Die Knochenmarkaspirate dieser Patienten wurden mit Hilfe der MASA-PCR auf alle 7 möglichen Mutationen hin untersucht. Bei keiner Probe wurde eine Mutation nachgewiesen.

3.3 Nachweis von K-ras Mutationen in der Sequenzierung.

In einem Vorversuch ließ sich zeigen, dass ein Nachweis einer K-ras Mutation durch Sequenzierung (Ablauf der Sequenzierung s. 2.2.6) bei einem Gemisch aus Tumor-DNA und Wildtyp-DNA (hier aus SW 480-Zellen und aus Blut) bis zu einem Verhältnis von 1:5 sicher möglich war. Bei einem Verhältnis von 1:10 war keine Mutation nachweisbar. Das Ergebnis des Vorversuches ist in Abbildung 11 dargestellt. Eingekreist ist immer die 2. Stelle des Codon 12, an der bei SW 480-Zellen die Mutation von GGT zu GTT zu erwarten ist. Die Sequenz wird immer von unten nach oben gelesen. In Abbildung 11 sieht man in der ersten Spalte die Sequenzierung der DNA aus der Tumorzelllinie SW 480 in der K-ras-Region. Es lässt sich sicher die Sequenz GTT an Codon 12 ablesen. In der 2. Spalte ist DNA aus tumorfreiem Probandenblut eingesetzt. Hier lässt sich die Wildtypsequenz GGT ablesen. In der 3. Spalte ist ein Verhältnis Tumor-DNA zu Wildtyp-DNA von 1:1, in der 4. Spalte 1:5 und in der 5. Spalte von 1:10 aufgetragen. In der 3. und 4. Spalte lässt sich die erwartete mutierte Sequenz von GTT neben der weiterhin vorhandenen Wildtypsequenz von GGT ablesen. In der 5. Spalte bei einem Verhältnis von 1:10 lässt sich die Wildtypsequenz GGT ablesen, wobei die mutierte Sequenz (GTT) in der 4. Bahn der 5. Spalte noch sehr schwach wahrgenommen werden kann.

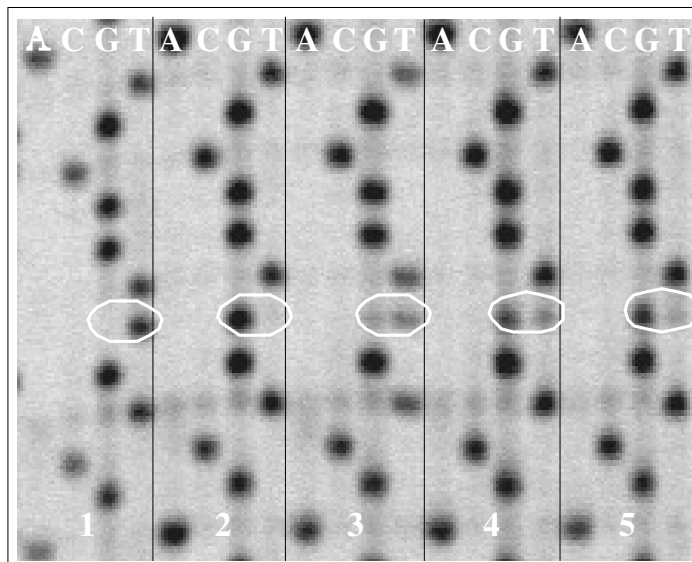


Abbildung 11: Sequenzierung einer Verdünnung von SW480-DNA in Wildtyp-DNA (Erläuterungen siehe Text).

In die Sequenzierung der Versuchsgruppe flossen 14 zufällig ausgewählte Proben von frischem Tumorgewebe ein. Hierbei ließ sich bei 2 Tumoren eine Mutation von GGT zu GTT und bei einem Tumor eine Mutation von GGT zu GAT an Codon 12 nachweisen. In Abbildung 12 ist der Nachweis der mutierten Sequenz in der digitalen Auswertung dargestellt. Im Kasten ist das Codon 12 markiert. Die Mutation von GGT zu GTT ist in Abbildung 12 exemplarisch an der Probe C 23 dargestellt.

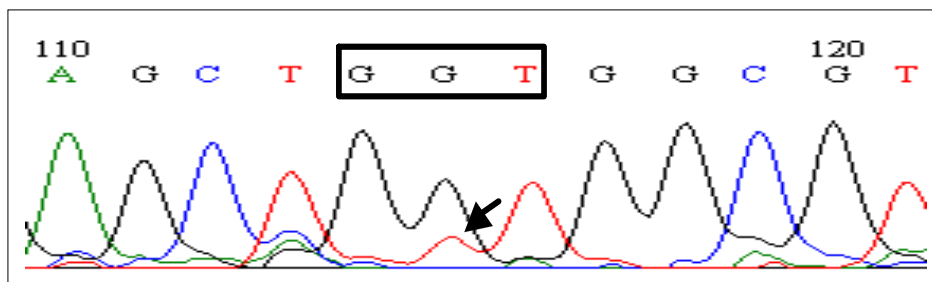


Abbildung 12: Digitale Auswertung der Sequenzierung der DNA von Tumor C23 (Erläuterungen s. Text).

Die übrigen 12 analysierten Tumore zeigten keine Mutation im Bereich des Codon 12 oder 13 des *K-ras*-Gens. Die digitale Analyse der Sequenzierung einer Tumor-DNA ohne Mutation ist im Bild exemplarisch in Abbildung 13 für die Probe C38 dargestellt. Man kann eindeutig die Sequenz des Wildtyps erkennen.

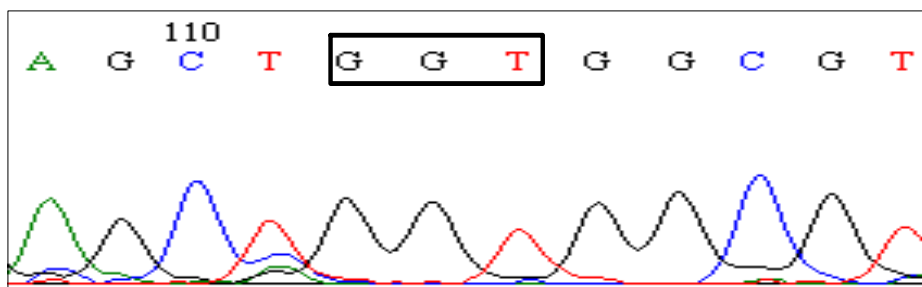


Abbildung 13: Digitale Auswertung der Sequenzierung der DNA von Tumor C38 (Erläuterungen s. Text).

3.4 Temporal Temperature Gradient Elektrophoresis (TTGE)

Mittels der „Temporal Temperature Gradient Elektrophoresis“ (s. 2.2.7) wurden 29 DNA-Proben, die aus Frischtumorgewebe gewonnen wurden, analysiert. Insgesamt konnte bei 6 Tumorproben (C 40, C 51, C 64, C 65, C82 und C 93) eine Mutation nachgewiesen werden.

In Abbildung 14 ist das Ergebnis einer TTGE-Analyse exemplarisch dargestellt. Hier zeigt sich, dass die Proben C 82 (Spur 4) und C 93 (Spur 12) eine Mutation tragen. In den Spuren 4 und 12 erkennt man je vier Banden, wobei die untere Bande dem Homoduplex aus der Wildtyp-DNA entspricht. Darüber findet sich in den Spuren 4 und 12 jeweils die Homoduplexbande der mutierten DNA. Die beiden oberen Banden in den Spuren 4 und 12 entsprechen jeweils dem Heteroduplex aus Wildtyp- und mutierter DNA. Dass es sich bei den Spuren 16 und 17 ausschließlich um homozygote Tumor-DNA handelt, zeigt das Auftreten von nur einer Bande mit einer von der Wildtyp-Homoduplex abweichenden Wanderungsstrecke im Gel. Das sehr ähnliche Bandenmuster in den Spuren 4 und 12 deutet auf das Vorliegen einer identischen Mutation in den entsprechenden Tumorproben hin. Die Laufstrecke der Homoduplexes war nahezu identisch zu der in Spur 16 als Kontrolle aufgetragener SW 480-DNA, was auf eine Mutation der Proben an der 2. Base des Codon 12 hinweist.

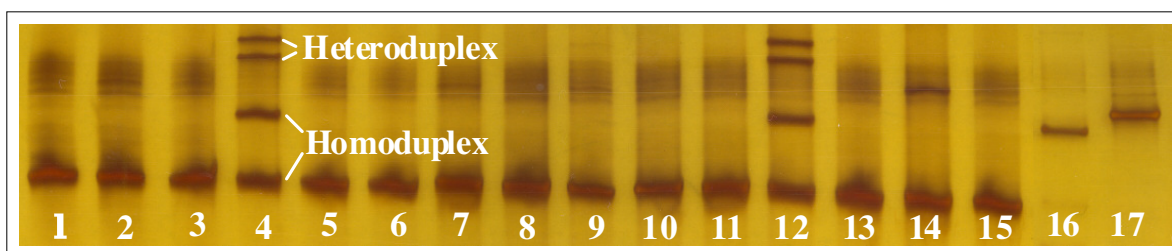


Abbildung 14: TTGE-Analyse von 15 Tumorproben und 2 Tumorzellreihen auf *K-ras*-Mutationen. Nachweis einer Mutation in Spur 4 und 12. (1: C67, 2: C76, 3: C81, 4: C82, 5: C83, 6: C85, 7: C86, 8: C87, 9: C97, 10: C91, 11: C92, 12: C93, 13: C94, 14: C95, 15: C96, 16: SW480, 17: A 549)

3.5 Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Analyse-Methoden

Tumorgewebe (frisch oder paraffingebettet) von 62 Patienten wurde in die Untersuchung einbezogen. Dabei konnte mit der optimierten MASA-PCR bei 18 Tumorgewebeproben unterschiedlicher Patienten eine *K-ras* Mutation nachgewiesen werden. Insgesamt konnte bei 10 Proben aus dem Frischtumorgewebe und bei 12 Proben aus dem paraffingebetteten Tumorgewebe eine *K-ras* Mutation detektiert werden. Von 13 Tumorproben lag überschneidend sowohl paraffingebettetes als auch frisches Tumorgewebe vor. Dabei zeigte sich bei vier (C 23, C38, C 40 und C 65) dieser überschneidend aus beiden Materialien vorliegenden Proben übereinstimmend die identische *K-ras* Mutation. Die verbleibenden 9 Proben aus beiden Materialien waren jeweils negativ für eine *K-ras* Mutation getestet worden.

Durch die Sequenzierung der DNA aus 15 Frischtumoren konnte bei insgesamt 3 Proben eine Mutationen gefunden werden. Bei 2 Proben (C 23 und C 64) konnte in der Sequenzierung die gleiche Mutation wie in der MASA-PCR detektiert werden. Eine in der Sequenzierung nachgewiesene Mutation von GGT zu GTT (C 48) zeigte in der MASA-PCR keinen Nachweis einer Mutation. Drei Proben (C38, C40, C51), die in der MASA-PCR eine Mutation aufwiesen, waren in der Sequenzierung negativ für die entsprechende Mutation. Bei den neun übrigen Proben konnte weder in der MASA-PCR noch in der Sequenzierung eine Mutation nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der TTGE-Analyse konnte bei 6 der 29 analysierten Proben aus dem Frischtumorgewebe eine Mutation nachgewiesen werden. Die Proben (C 40, C 51, C 64, C 65, C82 und C 93), die in der TTGE-Analyse einen Mutationsnachweis aufwiesen, zeigten übereinstimmend einen Nachweis für eine Mutation dieser Proben in der MASA-PCR. Die Proben, bei denen in der MASA-PCR keine Mutation detektiert werden konnte, wiesen in der TTGE-Analyse alle ein negatives Signal für eine Mutation auf. In der Probe C 48, welche in der Sequenzierung eine Mutation gezeigt hatte, konnte durch die TTGE-Analyse wie auch schon durch die MASA-PCR (s.o.) keine Mutation nachgewiesen werden. Die tabellarische Auflistung der kombinierten Untersuchungsergebnisse findet sich im Anhang (Tabelle 16).

3.6 Analyse der Patientendaten

Insgesamt flossen die Daten von 62 Patienten als Untersuchungsgruppe in die Ergebnisse ein, von denen das Tumorgewebe auf K-*ras* Mutationen in der MASA-PCR untersucht wurde. Das Altersmittel der Patienten betrug 69,83 Jahre mit einem Range von 46 bis 88 Jahre. Nach UICC-Tumorstadien teilte sich das in die Studie eingeflossene Patientenkollektiv wie folgt auf: Stadium I: 18 Patienten (29 %), Stadium II: 23 Patienten (37,1%), Stadium III: 12 Patienten (19,4%), Stadium IV: 9 Patienten (14,5%).

Die Patienten wurden postoperativ regelmäßig nachbeobachtet. Der Zeitpunkt der letzten Auswertung der Nachbeobachtung war der März 2004. Von den 62 Patienten lebten zum Zeitpunkt der letzten Auswertung noch 40 Patienten (65 %). Insgesamt waren 22 Patienten (35 %) verstorben, davon fünf Patienten (8 % aller Patienten) im ersten Monat, fünf Patienten (8 %) innerhalb der ersten 12 Monate, fünf Patienten (8 %) innerhalb von 24 Monaten, vier Patienten (6 %) innerhalb von 36 Monaten, ein Patient (1,5 %) innerhalb von 48 Monaten, ein Patient (1,5 %) innerhalb von 60 Monaten und zwei Patienten (3 %) innerhalb von 72 Monaten nach der Operation. Nach Tumorstadien (nach UICC) teilt sich die Gruppe der Verstorbenen wie folgt auf: Stadium I: vier Patienten (18,2 % der Verstorbenen), Stadium II: sechs Patienten (27,3 % der Verstorbenen), Stadium III: drei Patienten (13,6 % der Verstorbenen) und Stadium IV: neun Patienten (40,9 % der Verstorbenen).

Im Nachbeobachtungszeitraum wurden bei sieben Patienten (11,3 %) Metastasen gefunden. Zu einem lokoregionären Rezidiv kam es bei vier Patienten (6,5 %). Von diesen Patienten hatte einer das Tumorstadium I (nach UICC) und drei das Tumorstadium II.

Ein Patient (C84) hatte im Nachbeobachtungszeitraum zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils ein lokoregionäres Rezidiv und zusätzlich bei den Zeitpunkten jeweils neu aufgetretene Metastasen. Dieser Patient ist nach insgesamt 41 Monaten Nachbeobachtungszeit verstorben.

Von den sieben Patienten mit Metastasen sind bisher insgesamt vier (57 % aller Patienten mit Metastasen) verstorben. Von den Patienten mit einem Rezidiv sind zwei der vier Patienten bisher verstorben.

Vier der Patienten zeigten im Nachbeobachtungszeitraum ein Zweitkarzinom.

Im März 2004 (mit einer Nachbeobachtungszeit von 54 bis 82 Monaten) zeigten 36 Patienten (58 %) ein tumorfreies Überleben.

Die in den Primärtumoren gefundenen *K-ras* Mutationen (n=18) verteilten sich wie folgt auf die Patienten nach UICC-Tumorstadien: Stadium I: vier Mutationen (entspricht 22 % aller gefundenen Mutationen), Stadium II: sieben Mutationen (39 %), Stadium III : fünf Mutationen (28 %), Stadium IV: zwei Mutationen (11 %).

Die beiden Patienten, bei denen im Knochenmark eine *K-ras* Mutation gefunden werden konnten, hatten das Tumorstadium II und III. Bei der letzten Nachbeobachtung (80 und 78 Monate) zeigten diese Patienten jeweils ein tumorfreies Überleben.

Eine tabellarische Auflistung der Patientendaten findet sich im Anhang (Tabelle 17).

4. Diskussion

4.1 Literaturübersicht

Wie in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei dem kolorektalen Karzinom um die weltweit dritthäufigste Tumorart. Insgesamt erkrankten 1999 in Deutschland 53.000 Menschen neu an einem kolorektalen Karzinom. Im gleichen Zeitraum verstarben 29.100 Menschen an dem Tumor oder dessen Folgen. Dies entspricht ca. 50 % aller Patienten die pro Jahr neu an einem kolorektalen Karzinom erkranken. Statistisch gesehen beträgt das Lebenszeitrisko für jeden Menschen, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken ca. 4–6 % (Eickhoff et al., 2003). Allein an diesen Zahlen erkennt man die Bedeutung des kolorektalen Karzinoms für die Gesamtbevölkerung und für jeden einzelnen Menschen. Die Therapie der Wahl stellt die radikale Tumoresektion (R0-Resektion) dar. Dennoch kommt es in 15–30 % zu lokoregionären Rezidiven und in 50 % der Fälle zu Fernmetastasen (Mayer 2001, Hohenberger et al., 2003, Herold et al., 2003). Davon treten 85 % innerhalb der ersten 2 ½ Jahre und die restlichen 15 % nach weiteren 2 ½ Jahren auf (Seufferlein et al., 2003). Die Prognose der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom ist abhängig vom Tumorstadium, in dem der Patient unter einem kurativen Ansatz (R0-Resektion) operiert wird. Allerdings ist auch innerhalb einer Gruppe mit dem gleichen Tumorstadium der Verlauf heterogen. Es ist daher anzunehmen, dass einige der Patienten, denen eine gute Prognose aufgrund des Staging vorausgesagt wurde, ein schon fortgeschrittenes Erkrankungsstadium erreicht haben. Hier zeigten sich in mehreren Studien das Vorkommen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark als prognostisch ungünstiger Faktor (Schlimok et al., 1990 und 1991, Lindemann et al., 1992, Andreyev und Cunningham, 1997). Deshalb ist es für die weitere moderne multimodale Therapie wichtig, die Patienten mit einem hohen Risiko für Rezidive und Metastasen herauszufiltern, um diese dann ggf. einer prognoseverbessernden adjuvanten Chemotherapie zuzuführen. Anderen Patienten, die kein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Rezidivs oder von Metastasen tragen, könnte diese zum Teil belastende und damit die Lebensqualität einschränkende Chemotherapie erspart bleiben (Johnson et al., 1995).

Dass es bei kolorektalen Karzinomen und anderen malignen Tumoren wie dem Lungenkarzinom, dem Magenkarzinom, dem Nierenkarzinom und anderen zur Aussaat von Tumorzellen kommt, ist seit langem bekannt. Ein Nachweis von Tumorzellen in der Peritonealspülflüssigkeit wurde bereits 1867 erstmalig von Lucke und Klebs beschrieben (Lucke und Klebs, 1867). Disseminierte Tumorzellen konnten seitdem in verschiedenen Kompartimenten wie dem Peritoneum, den regionären Lymphknoten, dem venösen Blut und im Knochenmark mit unterschiedlichen diagnostischen Methoden gefunden werden. Hier kamen in der Vergangenheit klassische zytopathologische, immunzytochemische und zuletzt vermehrt auch molekulare Techniken zur Anwendung (Engell, 1955, Fisher und Turnbull, 1955, Schlimok et al., 1991, Leather et al., 1993, Takeda et al., 1993, Losi et al., 1996, Broll et al., 1999).

Schlimok et al. untersuchten 1991 das Knochenmark von Patienten mit einem Magenkarzinom auf disseminierte epitheliale Tumorzellen mittels immunzytochemischer Untersuchungsmethoden. Hierbei kamen monoklonale Antikörper zum Einsatz, die spezifisch für Cytokeratin 18 (CK 18), einem Anteil des Zytoskeletts epithelialer Zellen, sind. Insgesamt nahmen 97 Patienten an dieser Studie teil. Bei 34 % aller Patienten konnten CK 18 positive Zellen in signifikanter Anzahl im Knochenmark gefunden werden. Die von den Autoren angegebene Nachweisgrenze der disseminierten Tumorzellen lag bei einer auf $10^4 - 10^5$ Knochenmarkszellen.

Lindemann et al. (1992) untersuchten das Knochenmark von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom auf disseminierte Tumorzellen mittels immunzytochemischer Untersuchungen, auch unter Verwendung von einem Antikörper gegen CK 18. In dieser Untersuchung ließen sich bei 32 % der Patienten CK 18 positive Zellen im Knochenmarksaspirat nachweisen. Die Nachweisgrenze wurde mit einer Tumorzelle auf 10^5 kerntragende Knochenmarkszellen angegeben.

In der Nachbeobachtungszeit der beiden Studien zeigte sich für die Patienten mit einem positiven Nachweis von CK 18-positiven Tumorzellen im Knochenmark eine signifikant höhere Rate an Rezidiven und Metastasen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten erbrachten eine signifikante Korrelation zwischen einer ungünstigen Prognose der Patienten und dem immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark.

Little et al. (1997) konnten bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom über den immunzytochemischen Nachweis von Cytokeratin 20 eine disseminierte Tumorzelle auf $10^3 - 10^4$ physiologisch kerntragender Zellen des Knochenmarks nachweisen.

In einer Untersuchung von O`Sullivan et al. (1997) wurde die Anzahl von CK 18-positiven Zellen im Knochenmark von 72 Patienten, mit einem zum Untersuchungszeitpunkt nicht metastasierten Karzinom des Kolorektums, des Ösophagus oder des Magens durchflußzytometrisch ermittelt. In dieser Arbeit konnten durchschnittlich 30-90 CK 18-positive Zellen auf 10^5 physiologische Zellen des Knochenmarks detektiert werden.

Weitere Arbeiten, bei denen im Knochenmark von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren (Magen- und kolorektale Karzinome) disseminierte Zellen mittels immunzytochemischer Methoden detektiert wurden, wiesen eine schlechtere Prognose (Heiss et al., 1997) und/oder eine höhere Rate der Entwicklung von Metastasen (O`Sullivan et al., 1997) auf, als bei Patienten bei denen keine disseminierten Zellen zu finden waren.

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse sahen mehrere Studien das Knochenmark als einen wichtigen Ort an, um die Patienten, abhängig vom Nachweis disseminierter Tumorzellen, in verschiedene Subgruppen einzuordnen und ggf. einer adjuvanten Chemotherapie zuzuführen.

Allerdings gibt es bei den immunzytochemischen Verfahren mehrere Fehlerquellen, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Dies liegt zum einen an möglichen Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen als den gesuchten Zellen. Weiterhin kann es auch dazu kommen, dass Tumorantigene auf Oberflächen von Zellen der Immunabwehr präsentiert werden (Johnson et al., 1995). Ein weiterer Nachteil der immunzytochemischen Verfahren ist, dass auch falsch negative Ergebnisse auftreten können. Dies liegt beim Nachweis membrangebundener Antigene zum Teil daran, dass die entscheidenden Antigene durch andere Bestandteile der Zellwand verdeckt und daher nicht erfasst werden können (Broll et al., 1999).

Aufgrund der Unsicherheiten der immunzytochemischen Methoden sind die molekularen Nachweismethoden weiter in den Vordergrund gerückt. Ziel der molekularen Methoden war es, entweder das Korrelat der Genexpression, die mRNA, mittels der Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR) oder den auf der genomischen DNA lokalisierten Gendefekt über eine spezifische PCR nachzuweisen. Die Voraussetzung für ersteres ist, dass die mRNA nicht in normalen Wildtypzellen sondern nur in den gesuchten Tumorzellen deutlich vermehrt exprimiert wird. Bei der Analyse der DNA mittels spezifischer PCR ist es notwendig, dass die gesuchten Gendefekte bekannt und auf wenige Regionen (Hot-Spot-Regionen) begrenzt sind. Weiterhin müssen diese Gendefekte stabil und durchgehend in

allen disseminierten Tumorzellen nachzuweisen sein (Johnson et al., 1995, Broll et al., 1999).

Soeth et al. (1997) befassten sich mit der vergleichenden Analyse von Knochenmark und Blut bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren und mit der prognostischen Bedeutung der detektierten disseminierten Tumorzellen. In der Untersuchung kam eine RT-PCR der CK 20-mRNA zum Nachweis disseminierter Tumorzellen zur Anwendung. Insgesamt flossen 245 Patienten mit gastrointestinalen Tumoren in die Studie ein, von denen 117 Patienten ein kolorektales Karzinom, 79 Patienten ein Magenkarzinom und 49 Patienten ein Pankreaskarzinom aufwiesen. Von den Personen mit einem kolorektalen Karzinom konnte von 65 Patienten das Knochenmark, von 52 Patienten das venöse Blut und von 39 Patienten überschneidend Knochenmark und venöses Blut gewonnen und untersucht werden. Die untere Nachweisgrenze wurde mit 5–10 disseminierten Tumorzellen auf $2-4 \times 10^6$ physiologische Zellen (Knochenmark oder Blut) angegeben. Die Arbeit berichtet von einem signifikant höheren Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark im Vergleich zum venösen Blut bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom. Bei 20 der 65 Patienten (31 %) mit einem kolorektalen Karzinom wurden disseminierte Tumorzellen im Knochenmark detektiert. Dahingegen fanden sich im Blut nur bei 9 der 52 Patienten (17%) disseminierte Tumorzellen. Die Nachweisrate von disseminierten Tumorzellen war deutlich abhängig vom Tumorstadium. Die Arbeit von Soeth et al. (1997) unterstützt die Aussage, dass disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom eine negative prognostische Bedeutung zukommt. So zeigte sich im Rahmen der Nachbeobachtung, dass die Patienten, bei denen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark (und Blut) nachgewiesen worden waren, eine signifikant verkürzte Lebenserwartung besaßen.

Für die Identifizierung disseminierter Tumorzellen über den Nachweis von Genmutationen mittels PCR ist es, wie weiter oben in der Diskussion beschrieben, notwendig, dass die Genmutation bekannt und stabil in den disseminierten Tumorzellen zu finden ist. Die Genmutationen des kolorektalen Karzinoms (s. Einleitung 1.1.1) sind gut bekannt und von Vogelstein et al. (1988) parallel zur Adenom-Karzinom-Sequenz als dem klassischen Weg der Karzinomentstehung zusammengefasst worden. In der vorliegenden Untersuchung kamen die Mutationen des K-*ras* Gens als Ausgangspunkt der Suche nach disseminierten Tumorzellen mittels einer für Punktmutationen hochspezifischen PCR, der MASA-PCR, zur Anwendung. Das *Ras*-Gen und die Funktion des Genproduktes sind in der Einleitung beschrieben.

Es sind viele Nachweisverfahren mit unterschiedlichen Nachweisgrenzen, von denen einige im Folgenden exemplarisch genannt werden, zur Detektion von *K-ras* Mutationen beschrieben.

Lin et al. (1993) untersuchten Proben aus den Primärtumoren von 35 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom mittels der „Amplified Created Restriction Sites“ Methode. Methodisch handelt es sich um eine Kombination aus einer PCR mit spezifischen Primern für die *K-ras* Mutationen und einem zweiten Schritt mit Einsatz von Restriktionsendonucleasen zum Nachweis der *K-ras* Mutationen. Hier ließ sich in 20 % (7 Proben) der Fälle eine Mutation des *K-ras*-Gens finden, davon sechs in Codon 12 (3 x 1. Stelle, 2 x 2. Stelle, 1 x 3. Stelle) und eine in Codon 13 an der 2. Stelle. Eine untere Nachweisgrenze, mit der die *K-ras* Mutationen nachgewiesen werden konnten, wurde nicht angegeben.

Fox et al. (1998) konnten bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom mittels des „Amplification Refractory Mutation System“ (ARMS) in 36 % (108 von 295) der Tumorproben eine *K-ras* Mutation finden. Bei dem ARMS (Newton et al., 1989) handelt es sich um ein Verfahren welches im Prinzip der MASA entspricht, und bei dem ebenfalls über eine PCR mit spezifischen Primern die Mutationen nachgewiesen werden können. Untersucht wurden die Mutationen an der 1. und 2. Stelle des Codon 12, sowie eine Mutation in Codon 13 und zwar GGC zu GAC. Die untere Nachweisgrenze wurde mit einer Tumorzelle auf 1000 Wildtypzellen angegeben (Fox et al., 1998).

Losi et al. (1992) untersuchten das Vorkommen von *K-ras* Mutationen in kolorektalen Primärtumoren in Korrelation zu den im Verlauf aufgetretenen lokoregionären Rezidiven oder Metastasen. Hierbei wurden die Mutationen mit einer an die „Allele-Specific-PCR“ (ASPCR) (Saiki et al., 1986, Wu et al., 1989) anlehnenen Methode, der „Multiplex allele-specific PCR“ (Multiplex-ASPCR) gesucht. Für die „Multiplex allele-specific PCR“ wurden spezielle Primer benutzt, die an ihrem 3'-Ende die Base trugen, die komplementär zu der gesuchten Mutation war. Untersucht wurden jeweils die drei möglichen Punktmutationen an der ersten und zweiten Stelle des Codon 12, sowie die drei bisher in Tumoren gefundenen Mutationen des Codon 13 (GGC zu AGC, GGC zu CGC, CGC zu GAC). Als Polymerase kam die *Taq*-Polymerase zum Einsatz. Jeweils die drei Primer, die für die gleiche Stelle auf dem entsprechenden Codon spezifisch sind, wurden zu einem so genannten Set zusammen geführt. Dieses Set wurde dann als Sense-Primergemisch in den Reaktionsansatz pipettiert. Lief die PCR ab und es zeigte sich in der folgenden Analyse in einem Agarose-Gel eine Mutation, folgte eine „Allele-specific PCR“, bei der 3 Reaktionen

jeweils mit einem Sense-Primer durchgeführt wurden um so die genaue Mutation zu bestimmen. Dieses Vorgehen hatte das Ziel, die Anzahl der Reaktionen zu minimieren. Mit diesem Modus konnte die Gruppe bei 71 % der 35 untersuchten Patienten eine Mutation im Primärtumor finden. Weiterhin konnte in den Rezidiven oder Metastasen jeweils die gleiche Mutation wie in dem Primärtumor nachgewiesen werden. Die untere Nachweisgrenze wurde mit einer Tumorzelle auf 10^6 Wildtypzellen angegeben.

Takeda et al. (1993) untersuchten mit der „Mutant-Allele-Specific-Amplification“ (MASA) das Sputum bei Patienten mit einem Lungenkarzinom auf *K-ras* Mutationen. Diese Methode orientierte sich ebenfalls an den Arbeiten zur „Allele-Specific-Amplification“ von Saiki et al. (1986) und Wu et al. (1989). In dieser Untersuchung wurden ebenfalls spezifische Primer, die an Ihrem 3'-Ende jeweils die der Punktmutation entsprechende Base trugen, eingesetzt, wobei in dieser Arbeit, im Unterschied zu Losi et al. (1992) nur die Mutationen an der ersten und zweiten Stelle des Codon 12 untersucht wurden. Hierzu wurden jeweils die drei Primer für die Mutation an der ersten Base des Codon 12 und für die Mutation an der zweiten Base des Codon 12 zu einem Set zusammengefügt. In dieser Studie wurde nur die geringe Anzahl von 5 Patienten untersucht. Bei einem Patienten konnte eine Mutation mittels der MASA-PCR nachgewiesen werden. Eine untere Nachweisgrenze für die Detektion von *K-ras* Mutationen wurde nicht angegeben.

Hayashi et al. (1994) untersuchten bei 22 Patienten mit Hilfe der MASA-PCR die resezierten Primärtumoren und die korrespondierenden Lymphknoten auf das Vorhandensein von *K-ras* Mutationen. In sechs Proben aus den Primärtumoren konnten *K-ras* Mutationen (drei in Codon 12 und drei in Codon 13) gefunden werden. In der molekularen Untersuchung der Lymphknoten der (sechs vorher für die *K-ras* Mutation positiv getesteten) Primärtumoren zeigten sich fünf der sechs untersuchten Lymphknotenpakete *K-ras* positiv. Die in den Lymphknoten nachgewiesenen Mutationen entsprachen denen in den Primärtumoren. Bei drei der sechs *K-ras* positiven Primärtumoren, waren die korrespondierenden Lymphknoten vorher histopathologisch als vollständig tumorfrei eingestuft worden, wobei je Tumor und Patient drei bis achtzehn Lymphknoten histopathologisch untersucht wurden. Ein Lymphknotenpräparat, dessen korrespondierender Tumor eine *K-ras* Mutation trug, zeigte sich sowohl in der histopathologischen als auch der molekularen Untersuchung negativ. Des Weiteren konnte auch in den histopathologisch als nicht tumorfrei eingestuften Lymphknotenpräparaten in der molekularen Untersuchung in deutlich mehr Lymphknoten ein positiver Nachweis für

das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen geführt werden. Im Gegenschluss waren alle 18 Proben, bei denen im Primärtumor keine *K-ras* Mutation gefunden wurde, auch negativ bei der molekularen Untersuchung der Lymphknoten.

Ein Aspekt, den bis 1998 weltweit mehr als 75 Arbeiten betrachteten, war die prognostische Relevanz von *K-ras* Mutationen in malignen Tumoren. Allerdings kamen die verschiedenen Gruppen zu divergierenden Ergebnissen und Interpretationen hinsichtlich der prognostischen Aussage der *K-ras* Mutationen (Andreyev et al., 1998).

Die Arbeit mit den bisher meisten eingeschlossenen Patienten beschrieben Andreyev et al. 1998 in der „RASCAL“- und 2001 in der „RASCAL II“-Studie. Bei der von Andreyev et al. beschriebenen „RASCAL I“-Studie handelt es sich um eine Auswertung von Daten der Studien von 22 Arbeitsgruppen aus 13 Ländern, in die die Daten von insgesamt 2721 Patienten einfließen. In dieser großen Studie konnte unter der Anwendung unterschiedlicher molekularer Methoden [„Single-Strand Conformation Polymorphism“ (SSCP), PCR mit folgender Sequenzierung, „Allele-Specific-PCR“ mit und ohne folgende Hybridisierung], in 37,7 % aller untersuchten Tumorproben eine *K-ras* Mutation gefunden werden, wobei ausschließlich Mutationen auf Codon 12 und 13 untersucht wurden. Von den detektierten Mutationen lagen 80 % in Codon 12. 78 % dieser Mutationen fanden sich an der 2. Base. Eine multivariate Analyse der Ergebnisse ließ darauf schließen, dass sich die einzelnen Mutationen im Hinblick auf die Prognose unterschieden. In der Betrachtung zeigte sich bei einer *K-ras* Mutation mit einem Basenaustausch von Guanin zu Thymin ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv und Tod. Im Gegensatz dazu ging eine Mutation mit einem Basenaustausch von Adenin zu Cytosin nicht mit einer schlechteren Prognose einher. In der Analyse der individuell evaluierten Mutationen erwies sich die Mutation von GGT zu GTT, mit der Folge des Aminosäureaustausches im resultierenden Protein von Glycin zu Valin, als unabhängiger prognostischer Faktor. Hier zeigte sich ein signifikant erhöhtes Risiko für Rezidive und Tod.

In der von Andreyev et al. (2001) beschriebenen „RASCAL II“-Studie flossen Daten von 3439 Patienten aus 39 Zentren in 19 verschiedenen Ländern ein. Diese Arbeit beschäftigte sich ebenfalls mit der Frage nach der prognostischen Bedeutsamkeit von *K-ras* Mutationen. In der „RASCAL II“-Studie wurde zusätzlich die prognostische Aussage der *K-ras* Mutation abhängig vom Tumorstadium analysiert. Die Daten der in der „RASCAL I“-Studie eingeschlossenen Patienten flossen in die „RASCAL II“-Studie mit ein. In der Studie bestätigte sich, dass die Mutation von GGT zu GTT des Codon 12, welche bei 8,6%

aller untersuchten Patienten gefunden wurde, als einzige eine statistisch signifikante Auswirkung auf die Prognose der Patienten hatte. In Korrelation zum Tumorstadium zeigte sich, dass diese Mutation in Zusammenhang mit dem Stadium Dukes C ein 50 % erhöhtes Risiko für ein Rezidiv oder Tod aufwies. Dieser Zusammenhang zwischen Mutation und Tumorstadium ließ sich für das Stadium Dukes B nicht zeigen, wobei die Autoren der Studie einräumen mussten, dass die Anzahl der untersuchten Patienten noch zu gering war, um eine signifikante statistische Aussage treffen zu können.

Gnanasampanthan et al. (2001) führten eine Untersuchung mit der Fragestellung durch, ob Patienten mit einem kolorektalen Karzinom im Stadium Dukes C mit einer bestimmten *K-ras* Mutation stärker von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren als andere. Insgesamt wurden 430 Patienten in die Studie eingeschleust, von denen insgesamt 208 eine adjuvante Chemotherapie erhielten. Bei 140 Patienten konnte aus den Primärtumoren mittels „Single-Strand Conformation Polymorphism“ eine *K-ras* Mutation nachgewiesen werden, von denen wiederum 69 Patienten eine adjuvante Chemotherapie erhielten. Bei 81 Patienten konnte eine *K-ras* Mutation auf Codon 12 und 13 gefunden werden, aus der ein Aminosäureaustausch von Glycin zu Aspartat resultierte. Weitere 20 Patienten wiesen eine Mutation in Codon 12 auf, die einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Valin zur Folge hatte. Bei 33 Patienten wurde die Lokalisation der Mutation in der Untersuchung nicht weiter spezifiziert. Diese Untersuchung ergab, dass Patienten im Stadium Dukes C, in deren Tumor-DNA eine *K-ras* Mutation in Codon 12 oder 13 auftrat, die nicht mit einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Aspartat einherging, von einer adjuvanten Chemotherapie hinsichtlich der Überlebenszeit signifikant profitierten.

4.2 Vergleich der angewandten Methodik mit in der Literatur beschriebenen Untersuchungen

Ziel unserer Untersuchung war die Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark über den Nachweis von *K-ras* Mutationen. Methodisch lehnt sich die Arbeit an die Studien von Wu et al. (1989) zur Allele-Specific-Amplification, Losi et al. (1992) zur Multiplex-Allele-Specific-Amplification-PCR, sowie Takeda et al. (1993) und Hayashi et al. (1994) zur MASA-PCR an. Allerdings unterschieden sich diese Arbeiten teilweise deutlich in der Auswahl der Reaktionsabläufe (Temperaturen und Zeiten), der

gewählten Konzentrationen an Templet und weiterer Bestandteile der Reaktionsansätze (Magnesiumchloridkonzentration, DNA-Polymerasen, dNTP).

Für die Methodik unserer Untersuchung der Knochenmarkproben war weiterhin zu bedenken, dass die vorherigen Arbeiten zum Teil an den Primärtumoren durchgeführt wurden und der Gehalt an mutierten Zellen dort erwartungsgemäß sehr hoch war. Little et al. (1996) gaben den Gehalt an Tumorzellen in den untersuchten Primärtumoren und Metastasen mit 10–60 % an.

In einer Arbeit zu der Anzahl an disseminierten Tumorzellen im Knochenmark konnten O'Sullivan et al. (1997) in der quantitativen Analyse im Mittel 30-90 disseminierte Tumorzellen auf 10^5 kerntragende Zellen im Knochenmark ermitteln. Aufgrund dieser wenigen zu erwartenden disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, war es notwendig, die Untersuchungsbedingungen so anzupassen, dass eine möglichst niedrige untere Nachweisgrenze erzielt werden konnte.

Der methodische Ablauf der Suche nach disseminierten Tumorzellen über den Nachweis von *K-ras* Mutationen im Knochenmark mittels der MASA-PCR gliederte sich daher in drei Abschnitte: 1. Anpassung der MASA-PCR-Bedingungen zur Optimierung der unteren Nachweisgrenze, 2. Nachweis der *K-ras* Mutation im Primärtumor aus dem frischen oder paraffineingebetteten Tumorgewebe und Überprüfung der MASA-PCR durch weitere Methodiken wie der TTGE-Analyse und der Sequenzierung und 3. Nachweis der übereinstimmenden *K-ras* Mutation im Primärtumor und in den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mittels der MASA-PCR.

Zur Verbesserung der unteren Nachweisgrenze wurden im Verlauf der Optimierung (s. 2.2.4.1 bis 2.2.4.9) der Untersuchungsbedingungen mehrere Faktoren variiert. Die Einflüsse der verschiedenen Faktoren wurden von Rhodes et al. (1997) beschrieben und die Variation in dieser Untersuchung teilweise umgesetzt. Diese Variationen der Untersuchungsbedingungen wurden an seriellen Verdünnungsreihen von Tumorzellen in Vollblut bzw. Knochenmark durchgeführt. Diese Vorgehensweise ist geeignet, um die später gefundenen Ergebnisse der Versuchsreihen vergleichbar zu machen (Johnson et al., 1995). Zum Einsatz kamen hier die Tumorzellreihen SW 480 und A 549 mit der jeweils bekannten Mutation im *K-ras*-Gen.

Die für die MASA-PCR benötigten Sense Primer wurden für die Mutation des Codon 12 nach Takeda et al. (1993) und für die Mutationen des Codon 13 modifiziert in Anlehnung an Losi et al. (1992) ausgewählt. Die entsprechenden benötigten Anti-Sense Primer wurden der Arbeit von Takeda et al. (1993) entnommen. Das Einfügen von Primern des β -

Globingens erfolgte als Positivkontrolle und ist der Untersuchung von Losi et al. (1992) entnommen.

Die für den Beginn der Optimierung ausgesuchten Temperaturen und Zeiten für die jeweiligen Schritte der PCR waren in Anlehnung an das Protokoll von Hayashi et al. (1994) und eigenen Vorversuchen ausgewählt. Die Optimierung erfolgte, wie unter Material und Methoden (s. 2.2.4.1 bis 2.2.4.9) beschrieben, in mehreren systematischen Schritten, um die bestmögliche untere Nachweisgrenze herauszuarbeiten. Hierbei konnte unter den optimierten Bedingungen eine untere Nachweisgrenze von 10^2 Tumorzellen auf 1 ml Blut bzw. Knochenmark ermittelt werden. In dem für die Verdünnungsreihen eingesetzten Milliliter Blut, an denen die Bedingungen optimiert wurden, waren im Mittel 3400 kerntragende Zellen/ μ l nachweisbar. Daraus resultiert nach Umrechnung eine Nachweisgrenze von 1 Tumorzelle auf $3,4 \times 10^4$ kerntragende Zellen. Vergleicht man die Nachweisgrenzen mit denen anderer Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen, wobei hier die disseminierten Tumorzellen nicht über den Nachweis von *K-ras* Mutationen erfolgte, wie z.B. den immunzytochemischen Nachweismethoden, zeigt sich die MASA-PCR zumindest als gleichwertig in Bezug auf die untere Nachweisgrenze. Diese lag beim immunzytochemischen Nachweis bei einer Tumorzelle auf 10^3 – 10^5 kerntragende Zellen im Knochenmark (Schlimok et al., 1991, Lindemann et al., 1992, Litle et al 1997). Im Vergleich mit anderen molekularen Methoden zeigt sich zum Teil eine Überlegenheit, bei denen die Nachweisgrenze bei einer Tumorzelle auf 100 bis 5000 kerntragenden Zellen wie bei der „Competitive Allele Specific Oligonukleotide Hybridisation“ (cASO), des „Amplification Refractory Mutation System“ (ARMS) oder der „Mutant Enriched Polymerase Chain Reaction“ (ME-PCR) lag (Carpenter et al., 1996). Andere molekulare Verfahren sind hinsichtlich der unteren Nachweisgrenze vergleichbar wie die „Enriched“ PCR amplification mit 1 Tumorzelle auf 10^4 kerntragende Zellen (Kahn et al., 1991) oder vermeintlich leicht überlegen wie der Nachweis von CEA mRNA mittels Nested RT-PCR (ca. 1 auf 10^6 kerntragende Zellen) (Neumaier et al., 1995).

Die Bedingungen und die Nachweisgrenzen der MASA, „Allele-Specific“ oder „Mutant–Allele–Specific–Amplification“-PCR variierten zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen stark.

Losi et al. (1992) beschrieben bei Patienten mit Rezidiven eines kolorektalen Karzinoms mit Hilfe der Multiplex-ASPCR eine sehr niedrige untere Nachweisgrenze von 5 Tumorzellen auf 10^6 kerntragende Zellen unter den von ihnen gewählten PCR-Bedingungen. Auffällig ist bei der letztgenannten Arbeit, dass hier neben der extrem

niedrigen unteren Nachweisgrenze, ein sehr hoher Nachweis (71 %) an *K-ras* Mutationen gezeigt werden konnte.

Rhodes et al. (1997) untersuchten daher die PCR-Methoden durch systematische Variation verschiedener für die Sensitivität und Spezifität wichtiger Parameter. Die Arbeit betrachtete die Auswirkungen der systematischen Veränderungen der Magnesium-Konzentration, der Konzentration an eingesetztem Templet, der dNTP-Konzentration, der Zyklenzahl und der Annealingtemperatur auf die untere Nachweisgrenze. Mit diesen Variationen sollte versucht werden, die untere Nachweisgrenze so zu beeinflussen, dass eine möglichst geringe Konzentration an mutierter DNA unter hoher Menge an Wildtyp DNA ausreicht um eine Mutation sicher nachweisen zu können. Unter den von Rhodes et al. optimierten PCR-Bedingungen konnte eine untere Nachweisgrenze von einem mutierten Allel unter 10^2 – 10^4 Kopien erzielt werden.

Um zu zeigen, dass die in der MASA-PCR gefundenen Mutationen vorhanden waren und keine falsch positiven Signale darstellten, kam bei den eigenen Untersuchungen ein weiteres Nachweisverfahren zum Einsatz. Dabei wurde die Codon 12 und 13 des *K-ras*-Gens beinhaltende Region von 14 aus dem Frischtumorgewebe isolierten DNA-Proben sequenziert. Vor der Analyse der Proben wurde eine Versuchsreihe mit definierten Mengen an mutierter DNA in Wildtyp DNA sequenziert in der Kenntnis, dass die Aussage einer Sequenzierung abhängig ist von dem Verhältnis von mutierter zu Wildtyp-DNA und dass bei starkem Überwiegen der Wildtyp-DNA in der Sequenzierung nur die Wildtypsequenz abzulesen ist (Fox et al. 1998).

Als weiteres Verfahren zum Nachweis einer *K-ras* Mutation kam die TTGE-Analyse zur Anwendung. Bjørheim et al. (1998) führten im Rahmen der vergleichenden Analyse mehrerer Untersuchungsmethoden den Vergleich der Allele-specific-Amplification mit der TTGE-Analyse durch. Sie konnten mit der TTGE-Analyse in 32,5 % (62 von 191) der untersuchten Proben aus Tumorgewebe von Patienten mit kolorektalen Karzinomen eine *K-ras* Mutation nachweisen. Diese Nachweishäufigkeit deckt sich mit der in der Literatur angegebenen Häufigkeit für *K-ras* Mutationen in kolorektalen Karzinomen (Andreyev et al, 1998 und 2001). Aufgrund der Übereinstimmung der von Bjørheim et al. gefundenen und in der Literatur angegebenen Nachweishäufigkeiten von *K-ras* Mutationen, ist die TTGE-Analyse ein sicheres Verfahren zum Nachweis von *K-ras* Mutationen in Primärtumoren.

4.3 Kritische Einordnung der eigenen Ergebnisse mit früheren Untersuchungen und daraus resultierende Schlussfolgerungen

In der hier dargestellten Untersuchung flossen insgesamt 62 Patienten ein. Im Vergleich zu den Studien RASCAL und RASCAL II (Andreyev et al., 1998 und 2001) entspricht die Anzahl der untersuchten Personen nur einem kleinen Patientenkollektiv mit geringerer Aussagekraft. Das Altersmittel der untersuchten Patienten entspricht mit 69,8 Jahren denen der RASCAL-Studie (68 Jahre). Die Verteilung der Tumorstadien zeigte im Vergleich zur RASCAL II Studie (2001) einen Trend zu den niedrigeren Tumorstadien. So waren in unserer Untersuchung 29 % der Patienten als Dukes A, 37 % als Dukes B, 19 % als Dukes C und 15 % als Dukes D klassifiziert. In der RASCAL II Studie fand sich die Verteilung der Tumorstadien mit 15 % Dukes A, 42 % Dukes B, 30 % Dukes C und 13 % Dukes D. Bei der Verteilung der Tumorstadien in unserer Studie ist daher im weiteren Verlauf der Untersuchung mit einer geringeren Nachweisrate an disseminierten Tumorzellen in den Primärtumoren zu rechnen als sie bei dem großen Patientenkollektiv der RASCAL-Studien möglich gewesen wäre.

In der Literatur sind Nachweishäufigkeiten für eine *K-ras* Mutation in Primärtumoren bei kolorektalen Karzinomen von 20-70 % beschrieben worden (Vogelstein et al., 1988, Bos et al., 1987, Forrester et al., 1987, Losi et al., 1992). Die RASCAL-Studie (1998) ermittelte eine mittlere Häufigkeit von 37,3 %. Mit 28 % nachgewiesenen Mutationen in den Primärtumoren durch die MASA-PCR liegt die Nachweisrate unserer Untersuchung darunter. In der Verteilung der Mutationen auf die Codons 12 und 13 des *K-ras*-Gen zeigte sich eine deutliche Diskrepanz zur RASCAL-Studie (Mutationen des Codon 61 wurden nicht untersucht aufgrund des in der Literatur seltenen beschriebenen Vorkommens). Während bei letzterer 81 % der gefundenen Mutationen in Codon 12 und die restlichen in Codon 13 lagen, fanden sich in unserer Untersuchung alle gefundenen Mutationen ausschließlich in Codon 12. Die Ursache für diese Unterschiede sind am ehesten in der niedrigeren Patientenzahl unserer Studie zu suchen. Ein weiterer Grund dafür, dass *K-ras* Mutationen in Codon 13 in unserer Untersuchung nicht nachgewiesen wurden, könnte darin liegen, dass im Gegensatz zur RASCAL-Studie nur drei der sechs relevanten *K-ras* Mutationen des Codon 13 mittels der MASA-PCR untersucht wurden. Schaut man sich die Verteilung der *K-ras* Mutationen innerhalb des Codons an, zeigten sich in unserer Untersuchung 94 % an der zweiten Stelle des Codon 12 und die restlichen 6% an der ersten

Stelle des Codon 12. Die häufigste Mutation mit 61 % war die von GGT zu GAT mit dem resultierenden Aminosäureaustausch von Glycin zu Aspartat. Die zweithäufigste Mutation war GGT zu GTT mit dem Aminosäureaustausch zu Valin mit 33 %. Betrachtet man die absoluten Zahlen für den Nachweis an *K-ras* Mutationen in der RASCAL-Studie, zeigte sich auch dort die Mutation GGT zu GAT auf Codon 12 als die häufigste, gefolgt von der Mutation GGT zu GTT auf Codon 12 als der zweithäufigsten.

In der vergleichenden Analyse der Tumorproben mittels der TTGE-Analyse aus dem Primärtumorgewebe flossen 29 Patienten ein. Da es sich bei der TTGE-Analyse um eine Methode handelte, mit der die Zuverlässigkeit der MASA-PCR überprüft wurde, flossen nur 29 und nicht die volle Anzahl (n=62) an gewonnen Tumorproben in diese Untersuchungsreihe ein. Bei 6 Proben (21 %) konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der Untersuchung von Bjørheim et al. (1998) ist die Nachweisrate in unserer Studie deutlich geringer. Diese Arbeitsgruppe um Bjørheim konnte in 32,5 % der mittels TTGE-Analyse untersuchten Proben eine Mutation nachweisen. Das untersuchte Patientenkollektiv war allerdings mit 191 untersuchten Patienten deutlich größer als die 29 in unsere Untersuchung eingeschleusten Patienten. Dass die TTGE-Analyse als weiteres Verfahren zur Überprüfung der MASA-PCR sinnvoll war, zeigte dass alle in der TTGE-Analyse positiven Proben auch in der MASA-PCR einen positiven Nachweis für eine Mutation, und die in der TTGE-Analyse negativen Proben in der MASA-PCR keinen Nachweis für eine Mutation erbrachten. Aufgrund dieser Übereinstimmung in zwei voneinander unabhängigen Verfahren ist der Nachweis der Mutation mit den hier gewählten Reaktionsbedingungen der MASA-PCR als sicher anzunehmen.

In den Vorversuchen zur Sequenzierung, welche zur Überprüfung der MASA-PCR eingesetzt wurde, zeigte sich, dass bei einem Gemisch Tumor-DNA zu Wildtyp-DNA von 1:10 keine Sequenzierung der Tumor-DNA möglich war und sich lediglich die Wildtypsequenz ablesen ließ. Bei einem Verhältnis von 1:5 konnte die Sequenz der Mutation gut abgelesen und damit die Mutation identifiziert werden. Aus den eigenen Vorversuchen und den Untersuchungen von Fox et al. (1998) zur Sequenzierung von *K-ras* Mutationen geht hervor, dass eine 10 %ige oder kleinere Menge an Mutation tragender DNA unter der restlichen Menge an Wildtyp-DNA nicht ausreicht, um in der Sequenzierung die Mutation identifizieren zu können. Die Sequenzierung der 14 DNA-Proben der Primärtumoren erbrachte in drei Fällen (21 %) den Nachweis einer Mutation. Im Vergleich mit den Ergebnissen der MASA-PCR und der TTGE-Analyse zeigte sich in der Sequenzierung allerdings eine Diskrepanz zu den bisher erhobenen Befunden. Drei

Proben, die in der MASA-PCR und in der TTGE-Analyse sicher eine Mutation aufwiesen, wurden in der Sequenzierung negativ für eine Mutation getestet. Aufgrund dieser Ergebnisse zeigte sich die Sequenzierung nicht als ein sinnvolles Verfahren zur Kontrolle der in der MASA-PCR gefundenen Ergebnisse.

Unsere Untersuchung hatte zum Ziel, zu überprüfen, ob die in den Primärtumoren nachgewiesenen Mutationen auch in den korrespondierenden Knochenmarkaspiraten mit Hilfe der MASA-PCR zu finden waren. Insgesamt wurden 28 Knochenmarksproben untersucht, davon 18 Proben, deren Primärtumore eine Mutation aufzeigten, und weitere zehn willkürlich ausgesuchte Proben, bei denen in der DNA des Primärtumors keine Mutation gefunden werden konnte. In keiner der zehn willkürlich ausgesuchten Proben konnte mittels der MASA-PCR mit allen für die MASA-PCR optimierten Primern eine Mutation nachgewiesen werden. In 2 der 18 Knochenmarksproben, deren korrespondierender Primärtumor eine *K-ras* Mutation aufwies, wurde eine übereinstimmende Mutation, und damit das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen, nachgewiesen, bei einer von uns ermittelten unteren Nachweisgrenze von 10^2 Tumorzellen auf 1 ml Knochenmark. Ein Grund für die niedrige Anzahl von Patienten mit nachgewiesenen disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mittels der von uns gewählten und optimierten MASA-PCR ist in der geringen Anzahl an disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zu sehen. Als ein weiterer Grund für die geringe Anzahl an nachgewiesenen disseminierten Tumorzellen im Knochenmark kommt die Tatsache in Frage, dass in dem gewählten methodischen Ansatz zwar die DNA aus 1 ml Knochenmark gewonnen wurde, es aber zu Verlusten an Material während der Aufarbeitung kam, und pro Reaktion nur ein Teil der extrahierten DNA eingesetzt wurde. Aufgrund der geringen Anzahl an disseminierten Tumorzellen im Knochenmark scheint die von uns erarbeitete untere Nachweisgrenze der MASA-PCR nicht ausreichend zu sein, disseminierte Tumorzellen im Knochenmark sicher nachzuweisen.

Für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark über eine PCR zur Detektion von *K-ras* Mutation wäre es daher notwendig, die untere Nachweisgrenze zu senken. Hierzu haben Hardingham et al. (1993 und 1995) über die Immunomagnetic Beads mit anschließender PCR oder Inuma et al. (2000) mit einer CD 45 Magnetic Cell Separation mit anschließender „Nested“-MASA-PCR bereits Untersuchungen vorgelegt, mit der die untere Nachweisgrenze verbessert werden konnte. Über derartige Verfahren könnte der sichere sensitive und spezifische Nachweis von *K-ras* Mutationen in disseminierten Tumorzellen im Knochenmark erfolgen.

In dem Nachbeobachtungszeitraum der zwischen 51 bis 82 Monaten lag, entwickelten insgesamt sechs Patienten (10 %) eine Metastase, wovon ein Patient zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Nachbeobachtung je eine Metastase aufwies. Nur vier Patienten (6 %) zeigten in dem Nachbeobachtungszeitraum ein lokoregionäres Rezidiv. Diese Zahlen liegen bisher deutlich unter den in der Literatur beschriebenen. Besonders gering ist die Anzahl an lokoregionären Rezidiven, was für eine exzellente chirurgische Versorgung spricht. Auch die Zahl an Fernmetastasen ist bisher geringer als in der Literatur beschrieben (Mayer, 2001). Einschränkend ist allerdings zu sagen, dass der Nachbeobachtungszeitraum noch nicht ausreichend ist, dies abschließend beurteilen zu können.

Von den 18 Patienten, bei denen eine Mutation nachgewiesen werden konnte, entwickelten zwei Patienten Fernmetastasen und ebenfalls zwei Patienten ein lokoregionäres Rezidiv. Einen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und Grading zu dem Nachweis einer Mutation im Primärtumor lässt sich aufgrund der geringen Patientenzahlen allerdings nicht herstellen. Auch lässt sich aufgrund der geringen Patientenzahl keine signifikante Aussage über die Prognose aufgrund der nachgewiesenen Mutation treffen.

Bei einer ausreichenden Anzahl an Patienten zeigt sich, dass dem Nachweis von *K-ras* Mutationen eine prognostische Aussage zukommt (Andreyev et al, 1998 und 2001). Daher könnte der Nachweis von *K-ras* Mutationen in den Primärtumoren im Verlauf ein Baustein zur weiteren Stadieneingrenzung von kolorektalen Karzinomen werden und damit zu einer Differenzierung und Verbesserung der Therapieschemata führen. Das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ist in vielen Untersuchungen auch als prognostisch negativer Faktor gesehen worden. Daher erfolgte in dieser Untersuchung der Versuch, mittels der hochspezifischen und sensitiven MASA-PCR eine Aussaat von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zu finden, da andere z. B. immunzytochemische Verfahren einen hohen Anteil an falsch positiven Ergebnissen aufzeigten.

Abschließend lässt sich sagen, dass die MASA-PCR unter den gewählten Bedingungen ein geeignetes Verfahren ist, *K-ras* Mutationen in Primärtumoren spezifisch und sensitiv nachzuweisen. Dieses Verfahren, unter den von uns gewählten Bedingungen, reicht allerdings nicht aus disseminierte Tumorzellen im Knochenmark über die *K-ras* Mutation sicher und quantitativ nachzuweisen.

5. Zusammenfassung

Die hier vorgelegte Untersuchung befasste sich mit dem Nachweis von *K-ras* Mutationen in disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom mittels der Mutant-Allele-Specific-Amplification-Polymerasekettenreaktion (MASA-PCR). Die Bedeutung der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark für die Prognose der Patienten wird von mehreren Autoren vorausgegangener Studien als wichtig angesehen.

In die Untersuchung flossen 62 Patienten mit einem Altersmittel von 69,8 Jahren ein. Die Tumorstadien (nach UICC) wurden bei 29 % der Patienten als Dukes A, 37 % als Dukes B, 19 % als Dukes C und 15 % als Dukes D klassifiziert.

Die durchgeführte Untersuchung gliederte sich prinzipiell in zwei Teile. Erstens die Optimierung der MASA-PCR Bedingungen für die gesuchten Mutationen und für das Medium Knochenmark, und zweitens das Auffinden einer Mutation im Primärtumorgewebe und im korrespondierenden Knochenmarkaspirat. Zur Überprüfung der Spezifität der MASA-PCR wurden als weitere Analyseverfahren die Temporal Temperature Gradient Elektrophoresis (TTGE) und die Sequenzierung eingesetzt.

Im ersten Teil der Untersuchung wurden die verschiedenen Parameter der MASA-PCR (Annealingtemperatur, Zyklenzahl, Magnesiumkonzentration, Konzentration an Templet und dNTP und weitere Parameter) systematisch im Rahmen von Versuchsreihen mit Tumorzelllinien in seriellen Verdünnungsreihen optimiert. Hierbei konnte unter den optimierten Bedingungen eine untere Nachweisgrenze von 100 Tumorzellen auf die kerntragenden Zellen in 1 ml Blut bzw. Knochenmark erzielt werden.

Im zweiten Teil der Untersuchung wurden die optimierten Reaktionsbedingungen für die gewonnenen Tumor- und Knochenmarksproben angewandt. Insgesamt floss von 62 Patienten Material (Tumorgewebe und Knochenmark) in die Untersuchung ein. Dabei konnte bei 18 Proben aus dem Tumorgewebe eine Mutation mittels der optimierten MASA-PCR nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Häufigkeit von 28 % nachgewiesener Mutationen in der Tumor-Patienten-Gruppe. Diese Nachweishäufigkeit liegt unter der in den RASCAL-Studien gefundenen Häufigkeit von 37,3 %. Die Mutationen lagen alle ausschließlich in Codon 12. Davon befanden sich 94 % der nachgewiesenen Mutationen an der 2. Stelle des Codon 12, mit einer Häufigkeitsverteilung (bezogen Gesamtzahl der Mutationen) von 35 % der Mutation GGT zu GTT und 59 % von

GGT zu GAT. Die übrigen Mutationen befanden sich mit einer Häufigkeit von 6 % an der ersten Stelle des Codons 12 von GGT zu TGT.

Die zur Überprüfung der MASA-PCR durchgeführte TTGE-Analyse konnte bei 6 der 29 analysierten Proben aus dem Frischtumorgewebe eine Mutation nachweisen. Diese sechs Proben wiesen in der MASA-PCR ebenfalls eine Mutation auf, während die verbleibenden 23 Proben in beiden Verfahren negativ für eine Mutation waren. Aufgrund der Übereinstimmung der Ergebnisse der zwei verschiedenen Nachweismethoden kann geschlossen werden, dass die von uns gewählten MASA-PCR Bedingungen für den Nachweis von *K-ras* Mutationen in den Primärtumoren sinnvoll waren.

Im Rahmen der Sequenzierung konnte bei 3 von 15 Proben eine Mutation nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich deutliche Differenzen zur MASA als auch zur TTGE-Analyse. Die Sequenzierung erwies sich aufgrund der gefundenen Ergebnisse nicht als sinnvolles Verfahren zu Überprüfung der MASA-PCR.

Bei zwei Patienten, bei denen vorher eine Mutation im Primärtumor nachgewiesen werden konnte, wurde auch eine Mutation im Material aus dem Knochenmark gefunden. Die Nachweishäufigkeit von *K-ras* Mutationen im Knochenmark der Gesamtgruppe (n=62) entsprach damit 3 %. Bezogen auf die nachgewiesenen Mutationen in den Primärtumoren (n=18) ergab sich eine Nachweishäufigkeit von 11%.

Diese Daten zeigen, dass die MASA-PCR eine Methode ist, um disseminierte Tumorzellen im Knochenmark über einen spezifischen *K-ras* Mutationsnachweis zu detektieren. Allerdings war unter den in dieser Untersuchung gewählten PCR-Bedingungen die untere Nachweisgrenze nicht auszureichend, um *K-ras* Mutationen im Knochenmark mit der notwendigen Sensitivität nachzuweisen, da die in der Literatur beschriebenen Nachweishäufigkeiten signifikant höher lagen.

Hinsichtlich einer prognostischen Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark lässt sich aufgrund des kleinen Patientenkollektives, und der geringen Anzahl an Patienten bei denen disseminierte Tumorzellen gefunden wurden, keine signifikante Aussage treffen.

6. Literaturverzeichnis

Andersen TI und Borresen AL: Alterations of the TP54 gene as a potential prognostic marker in breast carcinomas. Advantages in using constant denaturant gel electrophoresis in mutation detection. *Diagn Mol Pathol* 4, 203-211 (1995)

Andreyev HJ, Cunningham D: Micrometastases: are they clinically significant disease? *Gut* 40, 555-556 (1997)

Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Carke PA: Kirsten *ras* mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 90, 375-384 (1998)

Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent – Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Ziets C, Trougos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JWC, Croke CT, O'Donoghue DP, Giarette W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesner R, de Goeij AFPM Arends JW, Andersen SN, Lövig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OPF, De Angelis P, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh, H-S, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubb VJ, Piris J, Cruickshank, Morton D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K, Urosevic N: Kirsten *ras* mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85, 692-696 (2001)

Bjørheim J, Lystad S, Lindblom A, Kressner U, Westring S, Wahlberg S, Lindmark G, Gaudernack G, Ekstrøm P, Røe J, Thilly WG, Børresen-Dale AL: Mutation analyses of *KRAS* exon 1 comparing three different techniques: temporal temperature gradient electrophoresis, constant denaturant capillary electrophoresis and allele specific polymerase chain reaction. *Mutat Res* 403, 103-112 (1998)

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR et al.: Prevalence of *ras* mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293-297 (1987)

Broll R, Windhövel U, Schiedeck Th, Duchrow M, Bruch HP: Immunzytochemischer und molekularer Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark, der Peritoneallavage, dem Blut und den regionären Lymphknoten. *Zentralbl Chir* 124, 286-291 (1999)

Carpenter KM, Durrant LG, Morgan K, Bennett D, Hardcastle JD, Kalsheker NA: Greater frequency of K-*ras* Val-12 mutation in colorectal cancer as detected with sensitive methods. *Clin Chem* 42, 904-909 (1996)

Chang SC: Haematoxylin-eosin staining of plastic-embedded tissue sections. *Arch Pathol* 93, 344-351 (1972)

Chen ZY und Zarbl H: A nonradioactive, allele-specific polymerase chain reaction for reproducible detection of rare mutations in large amounts of genomic DNA: application to human K-*ras*. *Anal Biochem* 244, 191-194 (1997)

Denis MG, Lipart C, LeBorgne J, LeHur PA, Galmich JP, Denis M, Ruud E, Truchaud A, Lustenberger P: Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 74, 540-544 (1997)

Eickhoff A, Maar C, Birkner B, Riemann JF: Dickdarmkrebs in Deutschland. *Internist* 44, 278 – 286 (2003)

Engell HC: Cancer cells in the blood. A five to nine year follow up study. *Ann Surg* 149, 475-461 (1959)

Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767, (1990)

Fearon ER: K- *ras* gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 1978-1980, (1993)

Fisher ER und Turnbull RB: The cytological demonstration and significance of tumor cells in mesenteric venous blood in patients with colorectal carcinoma. Surg Gynecol Obstet 100, 102-108 (1955)

Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M: Detection of high incidence of *K-ras* oncogenes during human colon tumorigenesis. Nature 327, 298-303 (1987)

Fox JC, England J, White P, Ellison G, Callaghan K, Charlesworth NR, Hehir J, McCartha TL, Smith-Ravin J, Talbot IC, Sary D, Northover JMA, Newton CR und Little S: The detection of *K - ras* mutations in colorectal cancer using the amplification-refractory mutation system. Br J Cancer 77, 1267-1274 (1998)

Gnanasampanthan G, Elsaleh H, McCaul K, Iacopetta B: Ki – *ras* mutation type and the survival benefit from adjuvant chemotherapy in Dukes`C colorectal cancer. J Pathol 195, 543-548 (2001)

Hardingham JE, Kotasek K, Farmer B, Butler RN, Mi JX, Sage RE und Dobrovic A: Immunobead-PCR: A technique for the detection of circulation tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. Cancer Res 53, 3455-3458 (1993)

Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE, Eaton MC, Pascoe VH, Dobrovic A: Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer by immunobead-PCR is a sensitive prognostic marker for relapse of disease. Mol Med 1: 789-794 (1995)

Hayashi N, Arakawa H, Nagase H, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, Takano S, Ogawa M, Nakamura Y: Genetic diagnoses identifies occult lymph node metastases undetectable by histopathological method. Cancer Research 54, 3853-3856 (1994)

Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S, Watanabe H, Ogawa M, Nakamura Y: Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer . Lancet 345, 1257-1259 (1995)

Hayashi N, Egami H, Kai M, Kurusu Y, Takano S, Ogawa M: No-touch isolation technique reduces intraoperative shedding of tumor cells into the portal vein during resection of colorectal cancer. *Surgery* 125, 369-374 (1999)

Herold: IV. Gastroenterologie – Kolorektales Karzinom

In: Herold: Innere Medizin 2003, 357 – 480, Gerd Herold, Köln, 2003

Heiss MM, Allgayre H, Gruetzner KU, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW: Clinical value of extended biologic staging by bone marrow micrometastases and tumor – associated proteases in gastric cancer. *Ann Surg* 226, 736 -745 (1997)

Hibi K, Robinson CR, Booker S, Wu L, Hamilton SR, Sidransky D und Jen J: Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer Patients. *Can Res* 58, 1405-1407 (1998)

Hohenberger W, Nömayr A, Merkel S: Chirurgische Therapie kolorektaler Karzinome, *Internist* 44, 311-321 (2003)

Iinuma H, Okinaga K, Adachi M, Suda K, Sekine T, Sakagawa K, Baba Y, Tamura J, Kumagai H, Ida A: Detection of tumor cells in blood using CD 45 magnetic cells separation followed by nested mutant allele – specific amplification of p53 and K – *ras* genes in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 89, 337-344 (2000)

International Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators: Efficacy of adjuvant fluorouracil and folonic acid in B2 colon cancer.. *J Clin Oncol* 17, 1356-1363 (1999)

Jackson DP, Lewis FA, Taylor GR, Boylston AW, Quirke P: Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 43, 499-504 (1990)

Johnson PWM, Burchill SA, Selby PJ: The molecular detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer* 72, 268 – 276 (1995)

Jorgensen OD, Kronborg O, Fenger C: A randomised study of screening for colorectal cancer using faecal blood testing: results after 13 years and seven biennial rounds. *Gut* 50, 29-32 (2002)

Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N, Ronai Z: Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant *K-ras* genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene* 6, 1079-1083 (1991)

Kampman E, Voskuil DW, Kraats van AA, Balder HF, Muijen van GN, Goldbohm RA und Veer van't P: Animal products and *K-ras* codon 12 and 13 mutations in colon carcinomas. *Carcinogenesis* 21, 307-309, (2000)

Knöpnadel J, Altenhofen L, Brenner G: Epidemiologische und gesundheitsökonomische Bedeutung des Darmkrebses in Deutschland. *Internist* 44, 268-277 (2003)

Kronborg O, Fenger C, Olson J, Jorgensen OD, Sondergaard O: Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal – occult - blood test. *Lancet* 30, 1467 – 1471 (1996)

Kwok S und Higuchi R: Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238 (1989)

Leather AJ, Gallegos NC, Kocjan G, Savage F, Smalles CS, Hu W, Boulos PB, Northover JM und Phillips RK: Detection and enumeration of circulating tumour cells in colorectal cancer. *Br J Surg* 80, 777-780 (1993)

Liebermann DA, Weiss DG: One – time screening for colorectal cancer with combined fecal occult – blood testing and examination of the distal colon. *N Engl J Med* 345, 555-560 (2001)

Lin SY, Chen PH, Wang CK, Liu JD, Siau CP, Chen YJ, Yang MJ, Liu MH, Chen TC, Chang JG: Mutation analysis of *K-ras* oncogenes in gastroenterologic cancers by the amplified created restriction sites method. *Am J Clin Pathol* 100, 686-689 (1993)

Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G: Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 340, 685 – 689 (1992)

Little VR, Warren RS, Moore II D, Pallavicini MG: Molecular cytogenetic analysis of cytokeratin 20-labeled cells in primary tumors and bone marrow aspirates from colorectal carcinoma patients. *Cancer* 79, 1664-1670 (1997)

Losi L, Benhattar J und Costa J: Stability of K-*ras* mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer* 28A, 1115-1120 (1992)

Lucke A, Klebs E: Beitrag zur Ovariectomie und zur Kenntnis der Abdominal-Geschwulste. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 41, 1-14 (1867)

Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, Jones J, Rockette H: Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes`B versus Dukes`C colon cancer. Results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C – 01, C – 02, C – 03 and C – 04). *J Clin Oncol* 17, 1349 – 1355 (1999)

Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM und Ederer F: Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 328, 1365-1371 (1993)

Mandel JS, Church TR, Ederer F, Bond JH: Colorectal cancer mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. *J Natl Cancer Inst.* 91, 434-437 (1999)

Mayer RJ: Gastrointestinal Tract Cancer (90)

In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL: *Harrison`s Principles of Internal Medicine*, 15th Edition, 578-588, McGraw – Hill, New York, 2001

Menke MA, Tiemann M, Vogelsang D, Boie C, Pawaresch R: Temperature gradient gel electrophoresis for analysis of a polymerase chain reaction – based diagnostic clonality assay in the early stages of cutaneous T – cell lymphomas. *Electrophoresis* 16, 733 – 738 (1995)

Messing J: New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101, 20-78 (1983)

Muto T, Bussey HJ, Morson BC: The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36, 2251-2270 (1975)

Neumaier M, Gerhard M und Wagner C: Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissue-specific genes. *Gene* 159, 43-47 (1995)

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17, 2503-2516 (1989)

O'Sullivan GC, Collins JK, Kelly J, Morgan J, Madden M, Shanahan F: Micrometastases: marker of metastatic potential or evidence of residual disease? *Gut* 40, 512-515 (1997)

Pool EH und Dunlop GR: Cancer cells in the bloodstream. *Am J Surg* 21, 99-102 (1934)

Pox C, Schulmann K, Schmiegel W: Konventionelles und molekulares Screening (Stuhltests). *Internist* 44, 287-293 (2003)

Rhodes CH, Honsinger C, Porter DM, Sorenson GD: Analysis of allele – specific PCR method for the detection of neoplastic disease. *Diagn Mol Pathol* 6, 49-57 (1997)

Riede UN, Schaefer HE: Digestorisches System – Dickdarm (12).

In: Riede UN, Schaefer HE: *Allgemeine und Spezielle Pathologie*, 4. Aufl., 660 – 734, Thieme, Stuttgart, 1995

Rosenbaum V, Riesner D: Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acid and proteins in purified form and cellular extracts. *Biophys. Chem.* 26, 235-246 (1987)

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction sites for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354 (1985)

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele - specific oligonucleotide probes. *Nature* 324, 163-166 (1986)

Sanger F, Nicklen S und Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467 (1977)

Schlimok G, Funke I, Bock B, Schweiberer B, Witte J und Riethmüller G: Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization and prognostic significance. *J Clin Oncol* 8, 831-837 (1990)

Schlimok G, Funke I, Pantel K, Stobel F, Lindemann F, Witte J und Riethmüller G: Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer* 27, 1461-1465 (1991)

Scholefield JH, Moss S, Sufi F, Mangham CM, Hardcastle JD: Effect of faecal occult blood screening on mortality from colorectal cancer: results from a randomised controlled trial. *Gut* 50, 840-844 (2002)

Seufferlein T, Lutz MP, Adler G: Multimodale Therapiekonzepte beim Kolonkarzinom. *Internist* 44, 322-335 (2003)

Soeth E, Vogel I, Röder C, Juhl H, Marxsen J, Krüger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H: Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 57, 3106-3110 (1997)

Span M, Moerkerk P, De Goeij A und Arends JW: A detailed analysis of K- *ras* point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 69, 241-245 (1996)

Stallmach A, Köhne G: Dickdarmerkrankungen 3.5.2

In: Alexander K, Daniel WG, Diener HG, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer S, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M: *Thiemes Innere Medizin TIM*, 1. Auflage, 591-605, Thieme, Stuttgart, 1999

Takeda S, Ichii S, Nakamura Y: Detection of K-*ras* mutation in sputum by mutant - allele - specific amplification (MASA). *Hum Mutat* 2, 112-117 (1993)

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preissinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532 (1988)

Volkenandt M, McNutt NS und Albino AP: Sequence analysis of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded human malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 18, 210-214 (1991)

Warburg O, Christian W: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfragments Enolase. *Biochem. Z* 310, 384-421 (1941)

Winkler R, Braun J: Kolon und Rektum (27)

In: Schumpelick V, Bleese NM, Mommsen U: *Chirurgie*, 3. Auflage, 543-584, Enke Verlag, Stuttgart, 1994

Wittinghofer A und Pai EF: The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *TIBS* 16, 382-387 (1991)

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB: Allele-specific enzymatic amplification of β - globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 2757-2760 (1989)

Zippelius A, Kufer P, Honold G, Köllermann MW, Oberneder R, Schlimok G, Riethmüller G, Pantel K: Limitations of reverse – transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. J Clin Oncol 15, 2701-2708 (1997)

7. Anhang

Tabelle 16 : Zusammenfassung der Ergebnisse der MASA-PCR, der Sequenzierung und der TTGE-Analyse.

Probe	Nachweis der K- <i>ras</i> Mutation in Frischtumor DNA	Nachweis der K- <i>ras</i> Mutation in Paraffintumor DNA	Sequenzierung	TTGE-Analyse	Nachweis der K- <i>ras</i> Mutation im Knochenmark
C9		Negativ			
C10		GGT=>GTT			Negativ
C12	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	
C13	Negativ	Negativ	Negativ		
C15		Negativ			
C16	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	
C17	Negativ		Negativ	Negativ	
C18	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	
C21		Negativ			
C22		Negativ			
C23	GGT=>GTT	GGT=>GTT	GGT=>GTT		Negativ
C24		Negativ			
C26		GGT=>GAT			GGT=>GAT
C27		Negativ			
C30		Negativ			
C32	Negativ	Negativ		Negativ	
C33		GGT=>GTT			Negativ
C35	Negativ		Negativ	Negativ	
C37		Negativ			
C38	GGT=>GTT	GGT=>GTT	Negativ		GGT=>GTT
C40	GGT=>GAT	GGT=>GAT	Negativ	Positiv	Negativ
C44		Negativ			
C45		Negativ			
C48	Negativ	Negativ	GGT=>GTT	Negativ	
C49		GGT=>GAT			Negativ
C51	GGT=>GTT		Negativ	Positiv	Negativ
C52	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	
C60	Negativ	Negativ	Negativ		
C61	Negativ			Negativ	
C62		GGT=>GAT			Negativ
C64	GGT=>GAT		GGT=>GAT	Positiv	Negativ
C65	GGT=>GTT	GGT=>GTT		Positiv	Negativ
C66	Negativ			Negativ	

C67	Negativ			Negativ	
C68		Negativ			
C69		GGT=>GAT			Negativ
C70		Negativ			
C74		Negativ			
C75		Negativ			
C76	Negativ			Negativ	
C77	Negativ	Negativ			
C78		Negativ			
C80		Negativ			
C81	Negativ			Negativ	
C82	GGT=>GAT			Positiv	Negativ
C83	Negativ			Negativ	
C84		Negativ			
C85	Negativ			Negativ	
C86	Negativ			Negativ	
C87	Negativ			Negativ	
C88		Negativ			
C89	GGT=>GAT				Negativ
C90		GGT=>GAT			Negativ
C91	Negativ			Negativ	
C92	Negativ			Negativ	
C93	GGT=>GAT			Positiv	Negativ
C94	Negativ			Negativ	
C95	Negativ			Negativ	
C96	Negativ			Negativ	
C97	Negativ			Negativ	
C98	GGT=>GAT				Negativ
C99		GGT=>TGT			Negativ

Tabelle 17: Zusammenfassung der Patientendaten mit Operationsdatum und Alter der Patienten, Tumorstaging und Grading, Nachbeobachtungszeitraum und Zeitpunkt des Auftretens von Rezidiven oder/und Metastasen

Probe	Geburtsdatum	OP-Datum	Alter	TNM-Klassifikation	Stadium	Dukes	Grading	Beobachtungszeitraum	verstorben	Lokalisation	Rezidiv	Metastase
C9	23.09.1918	15.03.1997	78	T2 N0 M1	IV	D	G3	34	Ja		Nein	Nein
C10	02.10.1919	18.03.1997	76	T1 N0 M0	I	A	G1	82	Nein	Rectosigmoid	Nein	Nein
C12	05.12.1939	21.03.1997	57	T2 N0 M0	I	A	G3	82	Nein	Aszendens	Nein	Nein
C13	29.03.1914	24.03.1997	79	T3 N1 M1	IV	D	G3	4	Ja	Sigmoid	Nein	Nein
C15	17.04.1941	07.04.1997	55	T1 N0 M0	I	A	G2	82	Nein	Rectum 7-12	Nein	3/2000
C16	22.10.1914	09.04.1997	82	T4 N1 M1	IV	D	G2	15	Ja	Sigmoid	Nein	Nein
C17	23.05.1929	17.04.1997	67	T2 N0 M0	I	A	G3	81	Nein	Rectum 7-12	Nein	Nein
C18	04.08.1945	18.04.1997	51	T3 N2 M0	III	C	G2	81	Nein	Rectum >12	Nein	Nein
C21	30.04.1928	05.05.1997	68	T3 N2 M1	IV	D	G3	1	Ja	Rectum 7-12	Nein	Nein
C22	02.03.1945	06.05.1997	51	T4 N0 M0	II	B	G2	80	Nein	Flexur re.	Nein	Nein
C23	18.12.1914	07.05.1997	83	T3 N0 M0	II	B	G2	0	Ja	Rectum >12	Nein	Nein
C24	22.04.1932	21.05.1997	64	T3 N0 M0	II	B	G2	80	Nein	Rectum 4-7	Nein	Nein
C26	10.12.1918	28.05.1997	79	T3 N0 M0	II	B	G3	80	Nein	Rectum >12	Nein	Nein
C27	08.01.1925	28.05.1997	71	T2 N0 M0	II	B	G2	80	Nein	Rectum 7-12	Nein	Nein
C30	17.03.1933	12.06.1997	63	T1 N0 M0	I	A	G2	80	Nein	Zoecum	Nein	Nein
C32	02.11.1921	16.06.1997	76	T3 N0 M0	II	B	G2	2	Ja	Rectum >12	Nein	Nein

C33	22.09.1925	23.06.1997	72	T3 N2 M0	III	C	G2	79	Nein	Sigmoid	Nein	Nein
C35	23.06.1940	30.06.1997	56	T3 N2 M1	IV	D	G2	10	Ja	Sigmoid	Nein	Nein
C37	14.09.1918	02.07.1997	79	T2 N0 M0	I	A	G2	64	Ja	Rectum >12	Nein	Nein
C38	04.02.1943	07.07.1997	53	T3 N2 M0	III	C	G2	78	Nein	Rectum 7-12	Nein	Nein
C40	28.04.1915	09.07.1997	81	T2 N0 M0	I	A	G2	78	Nein	Rectum >12	Nein	Nein
C44	30.09.1927	21.07.1997	59	T2 N0 M0	I	A	G2	78	Nein	Sigmoid	Nein	Nein
C45	03.07.1913	22.07.1997	84	T3 N2 M1	IV	D	G2	22	Ja	Transversum	Nein	Nein
C48	07.09.1927	04.08.1997	70	T3 N0 M0	II	B	G3	77	Nein	Aszendens	Nein	Nein
C49	07.11.1943	06.08.1997	54	T1 N0 M0	I	A	G2	71	Nein	Sigmoid	Nein	Nein
C51	20.12.1921	27.10.1997	75	T3 N0 M0	II	B	G2	35	Ja	Rectum 7-12	Nein	5/2000
C52	23.07.1938	13.11.1997	59	T3 N0 M0	II	B	G2	74	Nein	Rectum 7-12	Nein	Nein
C60	08.03.1925	24.02.1998	72	T3 N0 M0	II	B	G3	71	Nein	Aszendens	Nein	Nein
C61	26.10.1930	09.03.1998	67	T3 N0 M0	II	B	G3	70	Nein	Aszendens	Nein	Nein
C62	04.03.1926	11.03.1998	72	T2 N0 M0	I	A	G2	70	Nein	Rectum 4-7	Nein	Nein
C64	22.04.1921	25.03.1998	76	T3 N0 M0	II	B	G2	70	Nein	Rectum 4-7	4/2000	Nein
C65	29.01.1925	14.04.1998	73	T4 N0 M0	II	B	G3	2	Ja	Zoecum	Nein	Nein
C66	21.04.1929	16.04.1998	68	T3 N0 M0	II	B	G2	69	Nein	Sigmoid	Nein	Nein
C67	24.11.1923	28.04.1998	74	T4 N2 M0	III	C	G3	20	Ja	Aszendens	Nein	6/1999
C68	30.06.1939	11.05.1998	58	T3 N0 M0	II	B	G2	68	Nein	Rectosigmoid	Nein	Nein
C69	29.08.1937	12.05.1998	61	T3 N1 M0	III	C	G2	1	Ja	Rectum 4-7	Nein	Nein
C70	10.04.1939	15.05.1998	59	T3 N0 M0	II	B	G2	68	Nein	Analkanal	Nein	Nein

C74	11.03.1932	07.07.1998	66	T2 N0 M0	I	A	G2	66	Nein	Rectosigmoid	Nein	nein
C75	18.04.1928	27.07.1998	70	T3 N2 M0	III	C	G3	66	Nein	Rectum 4-7	Nein	Nein
C76	14.12.1923	08.12.1998	74	T3 N0 M0	II	B	G2	62	Nein	Sigmoid	Nein	7/2000
C77	13.09.1952	11.12.1998	46	T3 N2 M0	III	C	G3	62	Nein	Rectum 7-12	Nein	Nein
C78	01.04.1935	15.12.1998	63	T1 N0 M0	I	A	G3	59	Ja	re Flexur	7/2000	Nein
C80	16.02.1929	18.01.1999	69	T2 N0 M0	I	A	G3	0	Ja	Rectum 4-7	Nein	Nein
C81	14.12.1916	21.01.1999	82	T3 N0 M0	II	B	G3	60	Nein	Deszendens	Nein	3/2000
C82	15.09.1923	23.03.1999	75	T4 N0 M0	II	B	G1	58	Nein	Zoecum	12/00	nein
C83	22.12.1927	29.03.1999	71	T3 N2 M0	III	C	G2	58	Nein	Sigmoid	Nein	Nein
C84	25.09.1941	30.03.1999	57	T4 N0 M0	II	B	G3	41	Ja	Deszendens	6/1999 8/2000 4/2001	8/2000 4/2001
C85	20.08.1942	23.04.1999	56	T3 N0 M0	II	B	G2	57	Nein	Sigmoid	Nein	Nein
C86	01.06.1934	19.05.1999	62	T3 N1 M0	III	C	G2	56	Nein	Sigmoid	Nein	Nein
C87	24.02.1911	01.06.1999	88	T2 N0 M0	I	A	G2	56	Nein	Rectum 4-7	Nein	Nein
C88	19.12.1942	08.06.1999	56	T1 N0 M0	I	A	G2	24	Ja	Sigmoid	Nein	Nein
C89	25.03.1922	11.06.1999	77	T3 N0 M0	II	B	G2	56	Nein	Rectum >12	Nein	Nein
C90	08.05.1928	21.06.1999	71	T3 N1 M1	IV	D	G3	19	Ja	Rectum 7-12	Nein	Nein
C91	19.08.1922	07.07.1999	76	T3 N1 M0	III	C	G2	55	Nein	Sigmoid	Nein	Nein
C92	02.09.1945	21.07.1999	53	T2 N0 M0	I	A	G3	55	Nein	Rectum >12	Nein	Nein
C93	26.06.1931	26.08.1999	68	T2 N1 M0	III	C	G2	54	Nein	Rectum 4-7	Nein	Nein
C94	13.12.1948	10.09.1999	50	T3 N1 M0	III	C	G2	53	Nein	Sigmoid	Nein	Nein
C95	29.07.1935	15.09.1999	64	T4 N2 M1	IV	D	G3	0	Ja	re Flexur	Nein	Nein

C96	25.07.1931	25.10.1999	68	T3 N0 M0	II	B	G3	52	Nein	Rectum 7-12	Nein	Nein
C97	17.07.1920	01.11.1999	79	T2 N0 M0	I	A	G2	51	Nein	Sigmoid	Nein	Nein
C98	29.10.1927	09.11.1999	72	T3 N2 M1	IV	D	G2	10	Ja	Aszendens	Nein	6/2000
C99	19.02.1924	09.11.1999	75	T3 N0 M0	II	B	G2	33	Ja	Zoecum	Nein	nein

Text für die Patientenaufklärung:

Patientenaufklärungsbogen

zu den Untersuchungen

Nachweis von Tumorzellen bzw. Tumormarkern im Venenblut, Knochenmark und der Bauchspülflüssigkeit

Sehr geehrter Patient,

Sie werden wegen eines Tumorleidens im Bereich des Verdauungstraktes in den nächsten Tagen operiert. Um die Diagnose (Erkennung) eines Tumors zu verbessern, seine Ausdehnung, ein Wiederauftreten (Rezidiv) oder eine Tochtergeschwulst (Metastase) sowie die Prognose (Verlauf der Erkrankung) in Zukunft besser beurteilen zu können, führen wir die obigen Untersuchungen an unserer Klinik durch und bitten Sie um Ihre Mithilfe.

Wir wollen untersuchen, ab welchem Stadium Ihrer Erkrankung mit dem Auftreten von **Tumorzellen im Blut, im Knochenmark und in der Bauchhöhle** zu rechnen ist und ob daraus auf das spätere Auftreten von Absiedelungen des Tumors im Körper (Metastasen) zu schließen ist. Das gewonnene Wissen könnte dann zukünftig für die Behandlungsplanung der Patienten genutzt werden. Dazu ist es notwendig, mit speziellen Labormethoden Blut, Knochenmark und die Spülflüssigkeit des Bauchraumes auf Tumorzellen hin zu untersuchen. Zudem wird in Ihrem Blut **nach verschiedenen Markern** gesucht, die für Ihren Tumor spezifisch sind (sog. Tumormarker). Diese haben teilweise sehr komplizierte wissenschaftliche Namen und sollen hier der Vollständigkeit halber aufgelistet werden: CEA, L6, CA242, LSA, VEGF, p53, K-ras und Cytokeratin 20. Falls Sie eine genauere Information dazu wünschen, so fragen Sie bitte Ihren Arzt. Folgendes Vorgehen ist vorgesehen:

1. Vor der Operation und 1 Woche postoperativ erfolgt eine **venöse Blutentnahme**. Dieses Blut wird von uns auf das Vorkommen von Tumorzellen bzw. auf Tumormarker hin untersucht. Auch bei den regelmäßig durchzuführenden Nachsorgeuntersuchungen sollte, Ihr Einverständnis vorausgesetzt, Ihr Blut untersucht werden. Die Blutentnahme ist nahezu risikolos, gelegentlich tritt ein harmloser Bluterguß auf, selten kommt es zur Thrombose der Vene oder zur Verletzung eines Nerven.
2. Zu Beginn der Operation wird unter Narkose und unter strengen sterilen Bedingungen der Beckenkamm mit einer dünnen Nadel punktiert und eine geringe Menge Knochenmark gewonnen und auf Tumorzellen hin untersucht. Diese **Knochenmarkspunktion** ist in Narkose völlig schmerzfrei, die Risiken einer Blutung oder einer Infektion als sehr gering einzuschätzen.
3. Zu Beginn der Operation nach Eröffnung des Bauchraumes oder anlässlich einer Bauchspiegelung erfolgt eine **Spülung des Bauchraumes** mit Kochsalzlösung. Anschließend wird die Spülflüssigkeit im Labor ebenfalls auf Tumorzellen untersucht. Diese Spülung, die ohnehin mehrfach während einer Operation erfolgt, birgt keinerlei Risiken für Sie.
4. Nach Entfernung des Tumors wird von diesem ein **kleines Gewebestückchen entnommen** und im Labor ebenfalls untersucht.

Es steht Ihnen völlig frei, an diesen Untersuchungen teilzunehmen oder Ihre Zustimmung ohne Nennung von Gründen und ohne Nachteile für Sie zu verweigern oder später zurückzunehmen. Auch haben Sie die Möglichkeit, nur bestimmten Untersuchungen zuzustimmen. Im Falle einer Schädigung haftet das Land Schleswig-Holstein nach den allgemeinen Haftungsgrundsätzen. Falls Sie es wünschen, stehen wir selbstverständlich für weitere zusätzliche Informationen über die Untersuchungen zur Verfügung.

Lübeck, den _____

Unterschrift des Patienten

Einverständniserklärung

des Patienten/der Patientin

Name, Vorname

geb.

zur Teilnahme an den Untersuchungen

Nachweis von Tumorzellen bzw. Tumormarkern im Venenblut, Knochenmark und der Bauchspülflüssigkeit

Ich erkläre mich einverstanden zu folgenden Untersuchungen (bitte zutreffendes ankreuzen):

- ☐ Untersuchung des Venenblutes
- ☐ Untersuchung des Knochenmarks
- ☐ Untersuchung der Bauchspülflüssigkeit

Ich wurde von dem zuständigen Arzt _____ mündlich und schriftlich über Wesen, Bedeutung und Tragweite dieser Untersuchungen in verständlicher Form aufgeklärt, konnte Fragen stellen und stand nicht unter Zeitdruck. Ich weiß, daß ich diese Erklärung jederzeit und ohne Angabe von Gründen oder Nachteilen für mich widerrufen kann. Wenn bei der Operation der Tumor entfernt wird, bin ich darüberhinaus einverstanden, daß davon ein kleines Gewebestückchen entnommen und in einer sog. "Tumorbank" tiefgefroren wird, um es für zukünftige Untersuchungen nutzen zu können.

Ich stimme ferner zu, daß die Daten meiner Krankenakte und des weiteren Verlaufs meiner Erkrankung mit den Daten der obigen Untersuchungen verglichen werden können, sowie die Untersuchungsdaten gespeichert und zu wissenschaftlichen Zwecken verarbeitet werden dürfen, wobei die Vertraulichkeit der Daten gewahrt bleibt.

Lübeck, den _____

Unterschrift des Patienten

Lübeck, den _____

Unterschrift des aufklärenden Arztes

8. Danksagungen

An der Verwirklichung dieser wissenschaftlichen Arbeit haben viele Menschen mitgewirkt denen ich an dieser Stelle ausdrücklich danken möchte.

An erster Stelle will ich mich bei den vielen Patienten bedanken die sich bereitwillig, auch in Kenntnis der möglichen Komplikationen der Probenentnahme, für diese Untersuchung zu Verfügung gestellt haben. Ihnen gilt mein ganz besonderer Dank, da ohne sie diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Danken will ich hiermit auch meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rainer Broll, der mir das Thema der Dissertation zu Verfügung gestellt hat und Frau Dr. Ute Windhövel die mir als Betreuerin immer mit Ratschlägen zur Seite stand.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bruch und seinen ärztlichen und pflegenden Mitarbeitern, die für mich die Aufklärung der Patienten auf der Station und die Probenentnahme im Operationssaal durchführten.

Zu sehr großem Dank bin ich den aktuellen, aber auch einigen schon ausgeschiedenen, Mitarbeitern des Chirurgischen Forschungslabors verpflichtet. Sie haben mir in jeder nur möglichen Weise geholfen und immer für eine gute Stimmung und ein gutes Arbeitsklima gesorgt. Namentlich möchte ich mich bei Elke Gheribi, Vera Grobleben, Gisela Grosser-Pape, Regina Kaatz, Annemarie Aumüller, Carsten Pichler, Mirko Schmidt und Dr. Michael Duchrow bedanken.

Außerdem müssen hier die vielen anderen Doktoranden des Chirurgischen Forschungslabors genannt werden, mit denen ich viele Tage, Abende und so manches Wochenende verbracht habe. Mit Ihnen ist die Arbeit nie langweilig geworden und hat durch ein kollegiales Miteinander (fast) immer Spaß gemacht. Ein besonderer und sehr großer Dank geht an meinen „Mitdoktoranden“, Studienkollegen und Freund Herrn Patrick Lohmann, mit dem ich die meiste Zeit im Labor verbracht habe, und ohne den diese Arbeit undenkbar gewesen wäre.

Für die Hilfe bei der Korrektur dieser Dissertation möchte ich Frau Dr. Sabine Baumgartner ganz herzlich danken.

Zum Abschluss möchte ich meiner Familie danken. Hier sind an erster Stelle meine Eltern, Marita und Joachim Paulenz, zu nennen. Sie haben es mir ermöglicht mein Studium aufzunehmen und damit auch diese Dissertation zu bearbeiten. Ihnen gilt daher mein ewiger Dank für ihre großartige Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Meike bedanken, die mich schon seit dem Studium begleitet. Ohne sie und ihre motivierenden Worte wäre diese Promotionsarbeit nie zu einem Abschluss gekommen. Für ihre Geduld und Liebe die sie mir entgegenbringt kann ich ihr gar nicht genug danken.

Oldenburg im April 2005

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Lars Paulenz
Wohnort: Artillerieweg 29 a, 26129 Oldenburg
Geburtsdatum: 20.10.1970, Bremen
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

08/77-06/81 Grundschule Fährer Flur, Bremen
08/81-06/83 Orientierungsstufe des Gerhard Rohlfs Gymnasium, Bremen
08/83-06/87 Gerhard Rohlfs Gymnasium, Bremen
08/87-06/90 Schulzentrum Blumenthal, Gymnasium, Bremen

Berufsausbildung:

09/90-06/93 Berufsausbildung zum Industriemechaniker beim Bremer Vulkan mit anschließender Übernahme als Facharbeiter

Auslandsaufenthalt:

07/93-10/93 Aufenthalt in Kanada und den USA

Studium:

10/93-02/01 Eingeschriebener Student der Medizinischen Universität zu Lübeck

seit 05/97 Promotionsarbeit in der Klinik für Chirurgie der Medizinischen Universität zu Lübeck mit dem Thema „Nachweis von K-*ras* Mutationen in disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom mittels der „Mutant-Allele-Specific-Amplification-Polymerasekettenreaktion“ (MASA-PCR)

09/95	Physikum
03/97	1. Staatsexamen
09/99	2. Staatsexamen
10/00	3. Staatsexamen

Beruflicher Werdegang:

03/01-08/02	Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik I des Klinikum Oldenburg
Seit 10/02	Facharztweiterbildung im Fach Innere Medizin in der Medizinischen Klinik I des Klinikum Oldenburg

Oldenburg, den 01.06.2005

(Lars Paulenz)