

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

**Nachweis von K-ras-Mutationen in kolorektalen
Karzinomen und ihren disseminierten Tumorzellen
im Blut mit der
MASA (Mutant-Allel-Specific-Amplification)-Technik**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Patrick Lohmann
aus Dortmund

Lübeck 2004

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. R. Broll

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. hum. biol. H. W.
Stürzbecher

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2005

Zum Druck genehmigt, Lübeck den 08.06.2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Meinem Großvater
Herrn Walter Herfurth

1. EINLEITUNG	8
1.2. Klinik, Diagnostik und Therapie des kolorektalen Karzinoms	9
1.2.1. Risikofaktoren.....	10
1.2.2. Histologie.....	10
1.2.3. Chirurgische Therapie	11
1.2.4. Adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie und Radiatio.....	11
1.3. Disseminierte Tumorzellen	12
1.4. Die Adenom-Karzinom-Sequenz	13
1.5. Das Ras-Gen	14
1.6. Mutationen im K-ras-Gen	14
1.7. Die Polymerase-Ketten-Reaktion	16
1.8. Die „Mutant Allel Specific Amplification (MASA)“	16
1.9. Fragestellung	18
2. METHODEN	19
2.1. Die Zelllinien	19
2.2. Kultivierung der Zelllinien	19
2.3. Standard-Verdünnungsreihen mit Tumorzelllinien	20
2.4. DNA-Isolierung	20
2.5. Agarosegelelektrophorese	24
2.6. Sequenzierung	24
2.7. MASA-Polymerasekettenreaktion	28
2.7.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen	30
2.7.2. „Multiplex allel specific PCR“	38
2.7.3. Optimierung der Reaktionsbedingungen für die übrigen Primer.....	39
2.8. Patienten	40
2.9. Frischtumorproben	41

2.10. Herstellung von Hämatoxylin-Eosin-Präparaten zur histologischen Untersuchung der Frischtumorproben	41
2.11. Paraffintumorproben.....	42
2.12. Analyse der Tumor-DNA mit der MASA.....	42
2.13. Sequenzierung der Tumor-DNA zum Nachweis von K-ras-Mutationen	42
2.14. „Temporal Temperature Gradient Gelelektrophoresis“ (TTGE) der Tumor-DNA zum Nachweis von K-ras-Mutationen.....	43
2.15. Blutproben	44
2.16. Analyse der Blutproben mit der MASA.....	44
2.17. Analyse der Kontrollgruppenproben mit der MASA.....	45
3. ERGEBNISSE.....	46
3.1. Optimierung der MASA.....	46
3.1.1. Variation der Temperatur, Zyklenzahl und Magnesiumionenkonzentration	46
3.1.2. Einfluss der dNTP-Konzentration auf die MASA	48
3.1.3. Einfluss der eingesetzten DNA-Menge auf die MASA.....	48
3.1.4. Einfluss der β -Globin-Primer auf die MASA.....	48
3.1.5. Variation der Polymerasen	49
3.1.6. Die Nested MASA	50
3.1.7. Die Multiplex MASA.....	50
3.1.8. Optimierung der übrigen MASA-Primer.....	50
3.1.9. Optimierte Reaktionsbedingungen für die Analyse der Tumor-DNA auf K-ras-Mutationen	52
3.1.10. Optimierte Reaktionsbedingungen für die Analyse der Blut-DNA auf K-ras-Mutationen.....	53
3.2. Nachweis von K-ras-Mutationen in DNA von Frisch- und in Paraffin eingebetteten Tumoren mit der MASA	54
3.3. Nachweis von K-ras-Mutationen in DNA von Frischtumoren mit der Sequenzierung.....	54
3.4. Nachweis von K-ras-Mutationen in DNA von Frischtumoren durch die TTGE.....	56

3.5. Zusammenfassung des Nachweises der K-ras-Mutationen in Tumor-DNA durch MASA, Sequenzierung und TTGE	57
3.6. MASA Analyse der Blutproben der Tumor- und der Kontrollgruppe.....	57
3.7. Analyse der Überlebenszeit der nachuntersuchten Patienten	58
4. DISKUSSION	60
5. ZUSAMMENFASSUNG	70
6. MATERIAL.....	71
6.1. Einwegmaterial	71
6.2. Chemikalien und Lösungen.....	71
6.3. Geräte	76
7. ABKÜRZUNGEN	78
8. LITERATUR.....	80
9. TABELLEN	96
11. DANKSAGUNG	103
12. LEBENS LAUF	104

1. Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist mit einer Inzidenz von 34-71 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern im Jahr der häufigste maligne Tumor des Intestinaltraktes in Deutschland. Es ist der zweithäufigste maligne Tumor nach dem Mammakarzinom bei der Frau und der dritthäufigste nach dem Prostatakarzinom und dem Bronchialkarzinom beim Mann in der westlichen Welt. Die Inzidenz ist steigend (Schön et al., 1999). Bei beiden Geschlechtern ist es inzwischen zur zweithäufigsten Krebstodesursache geworden (Kullmann, 2003). Es tritt überwiegend nach dem 50sten Lebensjahr auf, kommt aber auch bei Patienten unter 30 Jahren vor. Das mittlere Erkrankungsalter ist bei Männern 67 und bei Frauen 72 Jahre (Schön et al., 1999; Robert Koch-Institut, 2002).

War die Fünfjahresüberlebensrate trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten bis Mitte der 90er Jahre nahezu unverändert bei 50% geblieben, so ist in den letzten Jahren eine leichte Verbesserung zu verzeichnen (Robert Koch-Institut, 2002). Die Lebensqualität konnte entscheidend verbessert werden (Lecomte et al., 2002). Für die Prognose des Patienten sind die lokale Tumorausdehnung, der Befall lokaler Lymphknoten und die Fernmetastasierung, zusammengefasst in den Stadien I-IV oder nach Dukes A, B, C und D entscheidend (Fisher et al., 1989; Wood, 1971) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Tumorstadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms. Abgewandelt nach UICC (Hermanek et al., 1992) und Dukes (1932) (T: Tumordinfiltration, N: Lymphknotenmetastasen, M: Fernmetastasen)

UICC-Stadium		TNM-Klassifikation	Dukes Stadien	5 Jahresüberleben *
	Carcinoma in situ	Tis N0 M0		
I	Ia. Beschränkung auf Mukosa und Submukosa Ib. Infiltration der Muskularis Propria	T1 N0 M0 T2 N0 M0	A	80-90%
II	Infiltration aller Wandschichten Überschreitung der Darmwand	T3 N0 M0 T4 N0 M0	B	60-80%
III	Regionale Lymphknoten oder Infiltration der Umgebung	Tx N1-3 M0	C	40%
IV	Fernmetastasen	Tx Nx M1	D	10%

* 5-Jahresüberlebesdaten nach Rich et al. (1983), Eisenberg et al. (1982) und Kullmann (2003).

Obwohl die Einteilung nach Stadien am zuverlässigsten den klinischen Verlauf voraussagt (Fisher et al., 1989; Wood, 1971), ist der Verlauf in der Gruppe eines Tumorstadiums heterogen (Schnipper, 1986; Ahnen, 1991; Heppner und Miller, 1989). So ist es möglich, dass ein Patient, der im Stadium II kurativ behandelt wurde, nach 10 Jahren tumorfrei ist und ein anderer Patient innerhalb von fünf Jahren an den Folgen der Metastasierung verstirbt. Deshalb gibt es große Bestrebungen, weitere Parameter zu finden, die eine zusätzliche Aussage zur Prognose geben können. Ziel ist es, Untergruppen zu bilden, von denen der Teil mit guter Prognose einer Nachsorge nach Tumorresektion und der andere Teil mit schlechter Prognose einer intensiven adjuvanten und/oder neoadjuvanten Therapie zugeführt werden kann. So wäre es einerseits möglich, die Überlebenschancen zu verbessern und andererseits die Lebensqualität zu steigern, indem man Patienten die adjuvante Therapie erspart (Johnson et al., 1995).

Neben vielen Parametern, die zurzeit untersucht werden, könnten die bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom nachgewiesenen Tumorzellen im Blut, so genannte disseminierte Tumorzellen, prognostisch richtungsweisend sein (Hamilton, 1999).

1.2. Klinik, Diagnostik und Therapie des kolorektalen Karzinoms

In der Regel bleibt der Tumor über lange Zeit klinisch stumm. Hinweisend sind Blut- und Schleimauflagerungen auf dem Stuhl und jegliche Stuhlnunregelmäßigkeiten ab dem vierzigsten Lebensjahr. Paradoxe Diarrhoen, d.h. Obstipation und anschließende Diarrhoe, Bleistiftstühle, unklare Gewichtsabnahme oder die Eisenmangelanämie sind unspezifische Hinweise auf ein fortgeschrittenes kolorektales Karzinom (Chang 1999).

Um eine Erkrankung auch vor Auftreten der beschriebenen Symptome feststellen zu können, wird mindestens einmal jährlich eine Vorsorgeuntersuchung durch die rektale digitale Untersuchung und je drei Hämoccult-Tests ab dem fünfzigsten Lebensjahr empfohlen. Ungefähr 20% der kolorektalen Karzinome sind im palpablen Bereich (Schön et al., 1999; Lang und Ransohoff, 1998). Die Spezifität des Hämoccult-Tests liegt bei 90%, die Sensitivität ist noch geringer (Pox et al., 2003). Nur 1/3 der positiven Hämoccult-Tests ist durch Neoplasmen bedingt (Mandel et al., 1993), Adenome und kleine Karzinome werden nur in 5-10% durch den Hämoccult-Test nachgewiesen (Ransohoff und Lang, 1991). Seit Oktober 2002 gehört eine Koloskopie ab dem 56sten Lebensjahr mit einer Folgeuntersuchung nach 10 Jahren zu den gesetzlichen Vorsorgeuntersuchungen. Die Hoffnung, durch frühere Diagnosestellung eine deutliche Reduktion der Mortalität zu

erreichen, ist groß (Knöpnadel et al., 2003). Tumormarker, wie die Konzentration des karzinoembryonalen Antigens (CEA), haben weniger für die Diagnose, als für den Verlauf erhebliche Bedeutung (Wagner, 2000). Der Nachweis von CEA-mRNA mittels RT-PCR im Serum (Neumaier et al., 1995), sowie der direkte molekulare Nachweis von Tumorzellen im Stuhl wird zurzeit in klinischen Studien erprobt, ist zur Vorsorge jedoch noch nicht etabliert (Pox et al., 2003). Bei den molekularen Verfahren werden Tumorzellen, z.B. über den Nachweis von APC-Mutationen (Traverso et al., 2002) oder *K-ras*-Mutationen (Sidransky et al., 1992; Tobi et al., 1994) mit der PCR oder anderen molekularen Verfahren detektiert.

1.2.1. Risikofaktoren

Als allgemeine Risikofaktoren gelten eine ballaststoffarme Kost, ein hoher Anteil an tierischen Fetten, der Verzehr von so genanntem „roten Fleisch“ und geringe körperliche Aktivität. Risikominimierend sind eine obst- und gemüsereiche Kost. Etwa 5-10% der kolorektalen Karzinome entstehen auf der Basis von erblichen Faktoren. Beispiele sind die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) oder das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom Syndrom (HNPCC). Die familiäre adenomatöse Polyposis coli, das Gardner-, Turcot- und Oldfield-Syndrom gelten als obligate Präkanzerosen. Auch eine langjährige Colitis ulcerosa erhöht das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Kullmann, 2003; Schmiegel et al., 2000).

1.2.2. Histologie

Histologisch handelt es sich in über 70% der kolorektalen Karzinome um Adenokarzinome, in 20% um Siegelring- oder Gallertkarzinome mit insgesamt schlechterer Prognose und selten um anaplastische Karzinome, Plattenepithelkarzinome oder Adenoakanthome. Metastasierungen sind am häufigsten in Leber (73%) und Lunge (10%) lokalisiert (Hohenberger et al., 2003). Knochenmetastasen sind mit 1-4% eher selten und befinden sich überwiegend in der Lendenwirbelsäule und im Becken (Talbot et al., 1989; Bonnheim et al 1986).

1.2.3. Chirurgische Therapie

Entscheidend für die Prognose ist die komplette Resektion (R0) des Tumors. 90% der Patienten mit Tumoren im Stadium I und 40-80% im Stadium II und III werden allein durch chirurgische Intervention geheilt, jedoch nur 10% im Stadium IV (Rich et al., 1983; Eisenberg et al., 1982). Angestrebt wird die kontinenserhaltende Resektion, die jedoch in der Regel nur bis zu einer Höhe von 5-7 cm ab ano empfohlen wird. Standardeingriffe sind die Hemikolektomie rechts, die Querkolonresektion, die Hemikolektomie links, die anteriore Rektumresektion und die nicht kontinenserhaltende abdominoperineale Rektumexstirpation (Chang 1999). Solitäre Metastasen in Lunge und Leber sollten unter kurativem Ansatz reseziert werden (Hohenberger et al., 2003; Nordlinger et al., 1996).

1.2.4. Adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie und Radiatio

Nach dem gegenwärtigen Stand der Medizin profitieren Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium III von einer adjuvanten Chemotherapie mit 5-FU und Leucoverin oder Levamisol. Patienten mit einem Rektumkarzinom wird eine kombinierte Therapie mit 5-FU und Strahlentherapie empfohlen. Ob auch Patienten im Stadium II von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren, ist noch nicht eindeutig geklärt (Mayo Clinic, 1999).

Patienten mit primär nicht resezierbarem kolorektalem Karzinom können unter bestimmten Voraussetzungen nach neoadjuvanter Chemotherapie, z.B. mit 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan, von einer operativen Therapie profitieren (Giacchetti et al., 1999).

Durch palliative Chemotherapie, das heißt bei inkompletter Resektion des Primärtumors oder seiner Metastasen, kann durch Gabe von 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden (Seufferlein et al., 2003).

1.3. Disseminierte Tumorzellen

Seit langem ist bekannt, dass Tumorzellen in die Blutbahn freigesetzt werden (Pool et al., 1934; Fisher und Thurnbull, 1955; Engell, 1955). Welche Bedeutung diese disseminierten Tumorzellen (von einigen Autoren auch Mikrometastasen genannt) für die Bildung von Fernmetastasen haben, ist noch nicht endgültig geklärt. Diskutiert wird, dass es sich bei den disseminierten Tumorzellen um Zellabschilferungen (cell shedding), Begleiterscheinungen der Primärerkrankung (residual disease) oder um Zellen mit Potential zur Metastasierung handelt (O'Sullivan et al., 1997). Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit kolorektalem, Brust-, Lungen-, Prostata- und Magenkarzinom wird in den meisten Studien als negativer prognostischer Faktor gesehen (Lindemann et al., 1992; Schlimok et al., 1990 und 1991; Andreyev und Cunningham, 1997). Über die prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen im venösen Blut liegen nur wenige Arbeiten vor, die zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen (Engell, 1959; Roberts et al., 1961; White und Griffiths, 1976; Leather et al., 1993; Johnson et al., 1995; Broll et al., 1999). Dies kann unter anderem an nicht standardisierten Untersuchungsmethoden liegen.

Nachgewiesen werden können diese disseminierten Tumorzellen u.a. über die Zytomorphologie, Immunhistochemie oder indirekt über den Nachweis von genetischen Mutationen des Primärtumors. Letzteres setzt voraus, dass diese Mutation in allen Tumorzellen nachweisbar ist und über den Tumorverlauf konstant bleibt. Dies ist beispielsweise bei Mutationen im *K-ras*-Gen der Fall. *K-ras*-Mutationen treten zu einem frühen Zeitpunkt in der Tumorentstehung auf (Fearon und Vogelstein, 1990). Viele Verfahren wurden zum Nachweis von *K-ras*-Mutationen mit unterschiedlichen Nachweisgrenzen entwickelt. Zum Beispiel die Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis (Nachweis einer Tumorzelle auf 10 Wildtypzellen), die competitive Allele Specific Oligonucleotide Hybridisation (cASO) (Nachweis einer Tumorzelle auf 100 Wildtypzellen), die Amplification Refractory Mutation System (ARMS) (Nachweis einer Tumorzelle auf 1000 Wildtypzellen), die Mutant Enriched Polymerase Chain Reaction (ME-PCR) (Nachweis einer Tumorzelle auf 5000 Wildtypzellen) (Carpenter et al., 1996), die Enriched Polymerase Chain Reaktion (Nachweis einer Tumorzelle auf 10^3 - 10^4 Wildtypzellen) (Kahn et al., 1991) und die Ligase Chain Reaktion (LCR) (Nachweis einer Tumorzelle auf 10^2 - 10^3 Wildtypzellen) (Lehman et al., 1996).

1.4. Die Adenom-Karzinom-Sequenz

Ein weitestgehend anerkanntes Modell der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms ist die Adenom-Karzinom-Sequenz (Muto et al., 1975). Bei diesem Modell wird von einem kontinuierlichen Übergang einer hyperproliferativen Schleimhaut zum frühen Adenom, intermediären Adenom, spätem Adenom bis zum Karzinom ausgegangen. Fearon und Vogelstein (1990) ordneten der histologischen Entwicklung der Neoplasie und deren Progression die jeweilige Mutation eines oder mehrerer Gene zu. Hierbei kommt es durch Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, z.B. durch chromosomale Deletionen und Translokationen zum unkontrollierten Zellwachstum und zur Karzinomentstehung. Einige genetische Veränderungen ordneten sie dieser Karzinomentstehung zeitlich zu (siehe Abbildung 1). Diese genetischen Veränderungen führen jedoch nicht allein und nicht zwingend zu einer malignen Entartung.

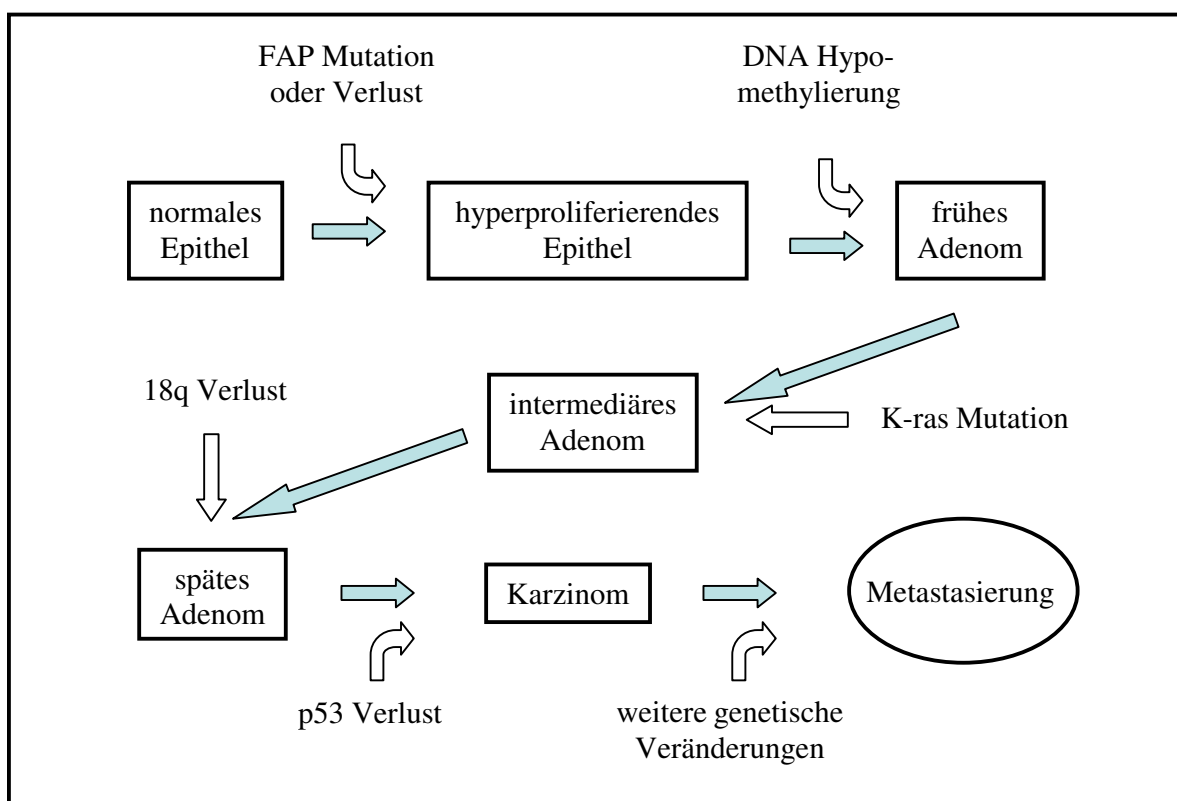


Abbildung 1: Genetisches Modell der kolorektalen Tumorentstehung. Abbildung modifiziert nach Fearon und Vogelstein (1990). FAP: familiäre adenomatöse Polyposis

Die Mutation im *K-ras*-Onkogen wird von Vogelstein et al. (1988) in die frühe Phase der Adenomentstehung eingeordnet und ist hier verantwortlich für eine clonale Vermehrung einer Adenomzelle und so für die Entstehung eines größeren, dysplastischen Polypen.

1.5. Das Ras-Gen

Die *Ras*-Protoonkogene *K-ras*, *N-ras* und *H-ras* kodieren für homologe 21 kDa Proteine. Diese spielen im Prozess des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle (Wittinghofer und Pai, 1991). Die Weiterleitung von extrazellulären Signalen zur Wachstumsstimulierung verläuft über eine intrazellulär liegende Kette von miteinander kommunizierenden Proteinen zum Zellkern. Das ubiquitär vorkommende Protein (p21 Ras) hat hierbei eine Schlüsselrolle. *Ras*-Genprodukte binden an Guaninnukleotide. Im inaktiven Zustand sind sie an GDP gebunden (Abbildung 2). In aktivem Zustand lösen sie gebunden an GTP wachstumsstimulierende Signale aus. Dieser nur sehr kurze Zustand wird durch eine intrinsische GTPase wieder aufgehoben, das GTP wird zu GDP hydrolysiert und das Ras-Protein befindet sich wieder im inaktiven Zustand (Egan et al., 1993).

1.6. Mutationen im *K-ras*-Gen

Punktmutationen an Kodon 12, 13 und 61 des *K-ras*-Gens führen zu einer veränderten sterischen Konfiguration des Proteins und reduzieren dadurch die eigene GTPase-Aktivität und die Fähigkeit mit GTPase aktivierendem Protein (GAP) zu interagieren (Fearon, 1993). So wird die Aktivität des Proteins nicht beendet und wachstumsstimulierende Signale wirken weiterhin auf die Zelle ein (Fukushima und Takenoshita, 2001).

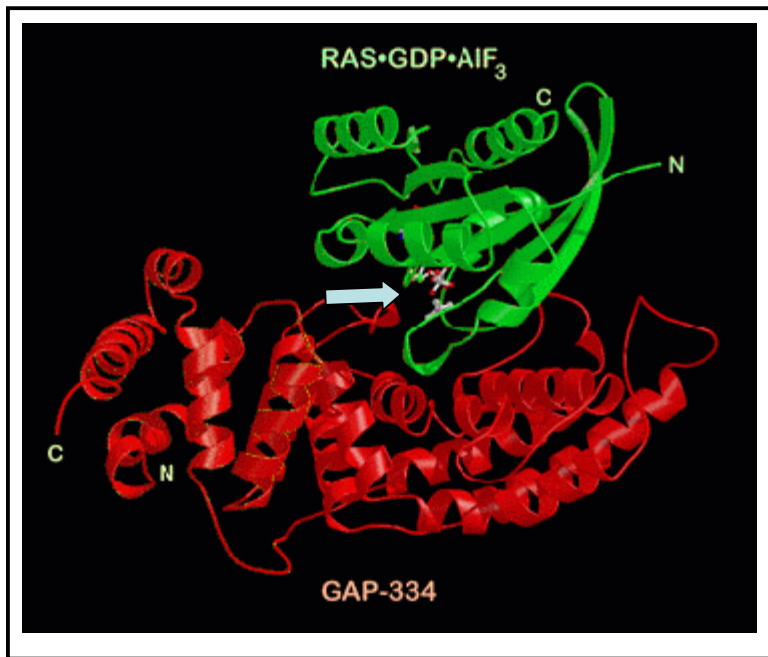


Abbildung 2: Die Abbildung zeigt das Ras-Protein (grün) im Komplex mit GTPase aktivierendem Protein (GAP) (rot). Der Pfeil weist auf das gebundene GDP. Abgewandelt nach Wittinghofer et al. (2003).

K-ras-Mutationen treten bei 27-50% der kolorektalen Karzinome auf (Bos et al., 1987 und 1989; Forester et al., 1987; Vogelstein et al., 1988; Shaw et al., 1991; Finkelstein et al., 1993; Olschwang et al., 1997; Andreyev et al., 1998; Font et al., Kampman et al., 2000; Bleeker et al., 2001). Diese Punktmutationen sind überwiegend in Kodon 12, 13 und 61 zu finden (Losi et al. 1992; Vogelstein et al., 1988; Fearon et al., 1990; Sistonen et al., 1986). Da sie an definierten Positionen in der DNA auftreten, werden diese Positionen auch „hot-spots“ genannt. Adenome unter einem Zentimeter Größe weisen in weniger als 10%, größere Adenome bis zu 50% Mutationen im *K-ras*-Gen auf (Vogelstein et al., 1988). Bei dysplastischen Polypen konnten häufiger *K-ras*-Mutationen als bei Polypen ohne Dysplasie nachgewiesen werden (Miyaki et al., 1990).

Eine im Karzinom aufgetretene *K-ras*-Mutation lässt sich in allen Metastasen (Lymphknoten und Fernmetastasen) und Rezidiven nachweisen (Losi et al., 1992; Dix et al., 1995). Es gibt 12 mögliche Mutationen in Kodon 12 und 13, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz im *K-ras*-Protein führen. 80% der Mutationen befinden sich in Kodon 12 (Bos et al., 1989; Vogelstein et al., 1988).

Die Angaben der oben genannten Autoren beziehen sich überwiegend auf eigene Untersuchungen mit kleineren Fallzahlen und Einsatz unterschiedlichster Nachweisverfahren. Um methodische und geographische Unterschiede auszugleichen, wurde die „RASCAL“ Studie durchgeführt. An ihr nahmen 22 Arbeitsgruppen aus 13

Ländern mit insgesamt 2721 Patienten mit kolorektalen Karzinomen teil. Die genomische DNA der Tumorresektate wurde mittels „Single Strand PCR (SSPCR)“, „Allel Specific PCR“, Hybridisierung mit allelspezifischen Primern oder direktem Sequenzieren der Proben auf Mutationen im Kodon 12 und 13 untersucht. Insgesamt 37,7% der Tumoren wiesen eine Mutation im *K-ras*-Gen auf, davon lagen 80,8% im Kodon 12 und 78,1% befanden sich an der zweiten Position von Kodon 12 oder 13. Die Nachbeobachtungen ergaben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Tumorrezidiven ($p=0.001$) und Tod ($p=0.004$) für Patienten mit *K-ras*-Mutationen, besonders für Punktmutationen im Kodon 12 (GGT) von Guanin zu Thymin (Andreyev et al., 1998). Untersuchte man ausschließlich Tumoren im Stadium Dukes B, so war die Prognose bei Tumoren mit Mutationen von GGT (Glycin) zu GAT (Aspartat) signifikant schlechter ($p=0.0001$) (Hayashi et al., 1999).

1.7. Die Polymerase-Ketten-Reaktion

Die von Saiki et al. (1986) entwickelte Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR, bietet die Möglichkeit, DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Selbst bei Vorliegen nur einer einzigen Kopie einer DNA-Matrize (Templet) (Saiki et al., 1988), kann mit Hilfe dieser Methode die DNA exponentiell vervielfältigt werden.

Das Prinzip der PCR beruht auf einem dreiteiligen Reaktionszyklus. Die Doppelstrang-DNA wird zunächst durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Synthetische Oligonukleotide, so genannte Primer, die komplementär zur zu untersuchenden DNA-Sequenz (Sense-Primer) oder deren Komplementärstrang (Antisense-Primer) ist, hybridisieren bei einer Temperatur zwischen 40°C und 70°C (Annealingtemperatur) an die DNA. Bei einer Temperatur von 72°C beginnt die Elongation und DNA-Synthese der thermostabilen DNA-Polymerase. Werden diese Schritte n-Mal durchlaufen, kommt es im Idealfall zu einer exponentiellen Vervielfältigung des DNA-Fragmentes zwischen den beiden Primern.

1.8. Die „Mutant Allel Specific Amplification (MASA)“

Das Prinzip der von Takeda et al. (1993) beschriebenen „Mutant Allel Specific Amplification“ (MASA) beruht auf einer fehlenden Vervielfältigung bei einem Basenmismatch am 3'-Ende des Sense-Primers. Speziell synthetisierte Primer, die einen

Basenaustausch am 3'-Ende bei ansonsten komplementärer Basensequenz besitzen, hybridisieren unter optimierten Bedingungen nur komplett, wenn eine zur veränderten Base komplementäre Mutation vorliegt. Ist dies nicht der Fall, so ist die DNA-Polymerase bei entsprechend spezifischen Bedingungen nicht in der Lage, an das 3'-Ende zu koppeln und es erfolgt keine DNA-Synthese (Abbildung 3). Bei komplementärer Basenpaarung kommt es zur Vervielfältigung des DNA-Abschnittes zwischen Sense- und Antisense-Primer, welche in einer Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden kann. Sind die eingesetzten Primer am 3'-Ende komplementär zu möglichen Punktmutationen, so können die synthetisierten DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Auf demselben Prinzip beruhen auch die „Allele Specific Amplification Method“ (Wu et al., 1989), die „Multiplex Allele Specific PCR (AS-PCR)“ (Losi et al., 1992), das „Amplification Refractory Mutation System (ARMS)“ (Newton et al., 1989) und die „PCR Amplification of Specific Alleles (PASA)“ (Sommer et al., 1989). Sie unterscheiden sich lediglich in der Vorbereitung der DNA und weiteren Analyse des PCR-Produktes (Cotton, 1993).

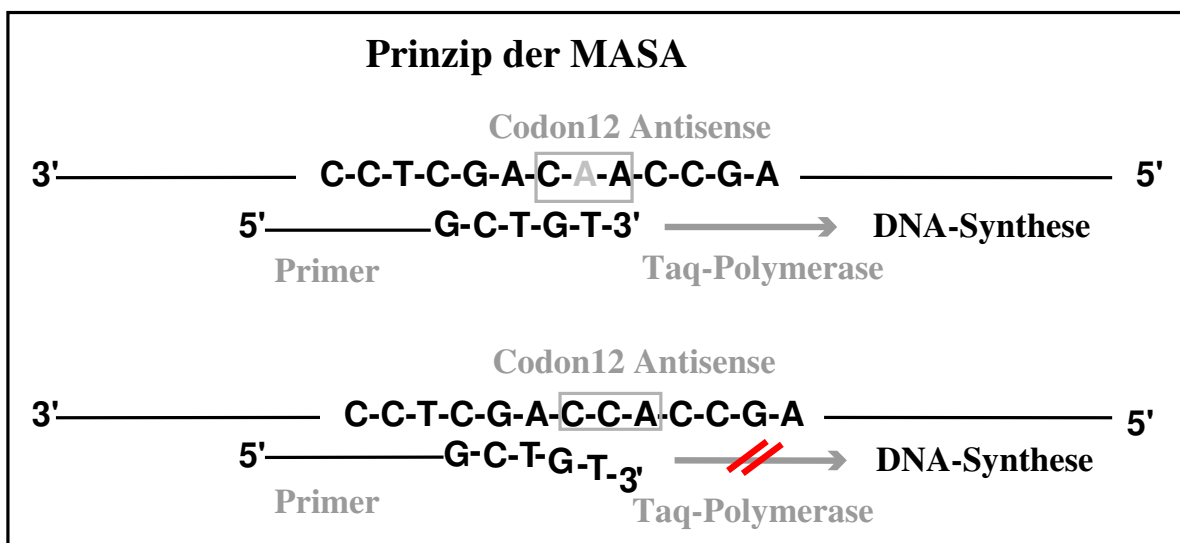


Abbildung 3: Schematisch dargestelltes Prinzip der MASA mit einem Primer zum Nachweis einer Mutation in Kodon 12 des *K-ras*-Gens von GGT zu GTT. Oben: erfolgreiche PCR bei Vorliegen einer Mutation im Kodon 12 an zweiter Stelle. Unten: keine DNA-Synthese bei Wildtyp-DNA durch Basenmismatch C zu T.

Die Punktmutationen müssen zum Nachweis durch die MASA an definierten Stellen in der DNA auftreten und die Basensequenz vor der Mutation muss bekannt sein. Hierzu eignen sich so genannte „hot-spots“. Dies sind Punktmutationen, die bei bestimmten Tumoren besonders häufig auftreten. Dies ist beim kolorektalen Karzinom im *K-ras*-Gen der Fall. Hier sind Mutationen an erster und zweiter Position im Kodon 12 von G zu C, T oder A und Mutationen an erster Position im Kodon 13 von G zu A oder C und an zweiter Position von G zu A zu finden. Alle anderen Mutationen sind sehr selten (Andreyev et al., 1998), oder führen nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz und haben damit keinen Einfluss auf die Tumorentstehung.

Mit der MASA wurden mutierte Zellen, gemischt mit Wildtypzellen, je nach Untersucher in einem Verhältnis 1 zu 10^2 (Losi et al., 1996), 1 zu 10^3 (Takeda et al., 1993 und Hayashi et al., 1994) und 1 zu 10^5 - 10^6 (Losi et al., 1992 und Watanabe et al., 1999) nachgewiesen. Mit dieser Methode wiesen Hayashi et al. (1994) und Hashimoto et al. (2000) disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten von Patienten mit kolorektalem Karzinom nach, die histologisch als tumorfrei klassifiziert wurden. Hasegawa et al. (1995) wiesen Tumorzellen im Stuhl von Patienten mit kolorektalem Karzinom und Watanabe et al. (1999) Pankreaskarzinomzellen im Duodenalsaft nach. Hayashi et al. (1999) wiesen bei 9 von 18 Patienten mit Kolonkarzinom intraoperativ im Portalvenenblut *K-ras*-Mutationen nach.

1.9. Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, zu klären, ob mit der MASA eine Methode entwickelt wurde, die es in ausreichender Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit ermöglicht, über den Nachweis von *K-ras*-Mutationen im Blut von Patienten mit kolorektalen Karzinomen, disseminierte Tumorzellen nachzuweisen. Hierzu war es zunächst nötig, die Bedingungen der MASA zu optimieren und die zu erreichende untere Nachweisgrenze zu bestimmen.

2. Methoden

2.1. Die Zelllinien

Die Kolonkarzinomzelllinie *SW-480* stammt von einem Kolonkarzinom des Stadiums Dukes B. Sie ist homozygoter Träger einer Mutation an der zweiten Stelle des Kodon 12 im *K-ras*-Gen GGT zu GTT. Dies hat eine Änderung der Aminosäuresequenz im Genprodukt von Glycin zu Valin zur Folge (Leibovitz et al., 1976).

Die Lungenkarzinomzelllinie *A-549* besitzt an der ersten Stelle von Kodon 12 des *K-ras*-Gens eine homozygote Mutation von GGT zu AGT. Dies hat eine Aminosäuresequenzänderung im Genprodukt von Glycin zu Serin zur Folge (Valenzuela und Groffen, 1986).

Die Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

2.2. Kultivierung der Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in 200 ml Kulturflaschen mit 50 ml Wachstumsmedium im Brut- und Begasungsschrank bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Passagen erfolgten einmal wöchentlich. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums für circa 10 min mit 7 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde nach der Inkubation 0,5 ml fetales Kälberserum (FKS) dazugegeben und die Zellen bei 1300 g für 5 min zentrifugiert, mit 5-8 ml PBS-Puffer gewaschen und zuletzt in 5-8 ml PBS-Puffer resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der erhaltenen Zellsuspension im Verhältnis 1 zu 10 mit Trypanblau vermischt und lichtmikroskopisch in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Da Trypanblau nicht durch die Membran lebender Zellen dringen kann, sind bei dieser Färbung nur tote Zellen intensiv blau gefärbt, vitale hingegen erscheinen farblos. Zellsuspensionen mit weniger als 80% lebender Zellen wurden verworfen. Jeweils 10⁶ Zellen wurden in 50 ml Wachstumsmedium zur weiteren Kultivierung in eine Kulturflasche ausgesetzt, bzw. zur Weiterverarbeitung in PBS-Puffer aufgenommen. Zwischen zwei Passagen erfolgte jeweils einmal ein Mediumwechsel.

2.3. Standard-Verdünnungsreihen mit Tumorzelllinien

Von den Tumorzelllinien *SW-480* und *A-549* (Kapitel 2.1) wurden Verdünnungsreihen in Vollblut eines gesunden Probanden erstellt. Das Probandenblut wurde in Ammoniumheparin-Monovetten abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Die Kulturzellen wurden vom Medium durch Zentrifugation und mehrmaliges Waschen mit 5 ml PBS-Puffer getrennt. Nach dem Zählen der Zellen in einer Neubauerzählkammer wurde eine definierte Anzahl mit dem Probandenblut gemischt. Um sicher zu gehen, dass es sich tatsächlich um die gewünschten Zellen handelte, wurde die gewonnene DNA vor Einsatz in der PCR, wie in Kapitel 2.6. beschrieben, sequenziert und die DNA-Sequenz mit der zu erwartenden Punktmutation verglichen.

Als Standardverdünnungsreihe galten absteigend $10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1, 10^0$ und 0 Tumorzellen pro einem Milliliter Probandenblut. Um Schwankungen in der Zellverteilung während der Verdünnung zu vermeiden, wurde ein Volumen von 5 ml Blut eingesetzt. Die Leukozytenkonzentration des Probandenblutes wurde nach Färbung mit Türk-Lösung in der Neubauerzählkammer ausgezählt und lag bei einer kerntragenden Zellkonzentration von 4,1 Terra/l (Nerle, 1992).

2.4. DNA-Isolierung

Die DNA wurde aus Blut, Zellkulturzellen und Frischtumoren mit dem Blood and Cell Culture DNA Kit (Qiagen) nach einer, vom Herstellerprotokoll leicht abgewandelten Anleitung, isoliert. Es wurden sowohl der Midi- als auch der Mini-Kit benutzt (schematische Darstellung in Abbildung 4).

Zur DNA-Isolation aus Zellkulturzellen, Blut und dem Gemisch aus Blut und Zellkulturen wurde ein Volumen der Probe mit einem Volumen Buffer C1 und drei Teilen H₂O bei 4°C zur Lyse der Zellen inkubiert und nach 10 min bei 1.300 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde bei der DNA-Isolationen aus Blut so lange wiederholt, bis das so gewonnene Pellet weiß gewaschen war. Das Pellet wurde dann in 1 ml Buffer G2 resuspendiert und für drei Stunden mit 25 µl Qiagen Protease zur Lyse der Zellkerne und Freisetzung der DNA bei 50°C im Wärmebad inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch über die mit dem Buffer QBT äquilibrierte Säule (Qiagen Genomic-tip) geschickt und anschließend dreimal mit einem Volumen Buffer QC gewaschen. Dabei bindet die DNA auf Grund ihres negativ geladenen Phosphatanteils an die positiv geladene Säule.

Proteine, RNA, Stoffwechselmetaboliten und Salze wurden ausgewaschen und die DNA anschließend zweimal mit einem Volumen Buffer QF in ein steriles 14 ml Röhrchen ausgewaschen. Zum weiteren Reinigen wurde das Gemisch mit 1,4 Volumen Isopropanol bei 4°C mindestens eine Stunde im Kühlschrank gefällt, anschließend bei 1.500 g für 30 min zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Nach Lösen der DNA in 200 µl TE-Puffer erfolgte erneutes Fällen mit 200 µl 5 M Ammoniumacetat und einem Milliliter eiskaltem Ethanol (96%) bei -20°C für mindestens eine Stunde. Nach dem Zentrifugieren bei 1.300 g und Trocknen des Pellets in der Sterilbank, wurde das Pellet in 50 µl TE-Puffer bei 65°C im Thermoschüttler bei 100 U/min für drei Stunden gelöst.

Zur Gewinnung der DNA aus Tumoren wurden ca. 100 mg Tumorgewebe nach dem Auftauen mit 2 ml General Lysis Buffer G2 und 400 µg RNase versetzt und mit dem Mikrodismembrator drei Minuten homogenisiert. Das Gemisch wurde danach mit 100 µl Qiagen Protease für 3 bis 5 h bei 50°C inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, auf die Säulen aufgetragen und weiterverarbeitet.

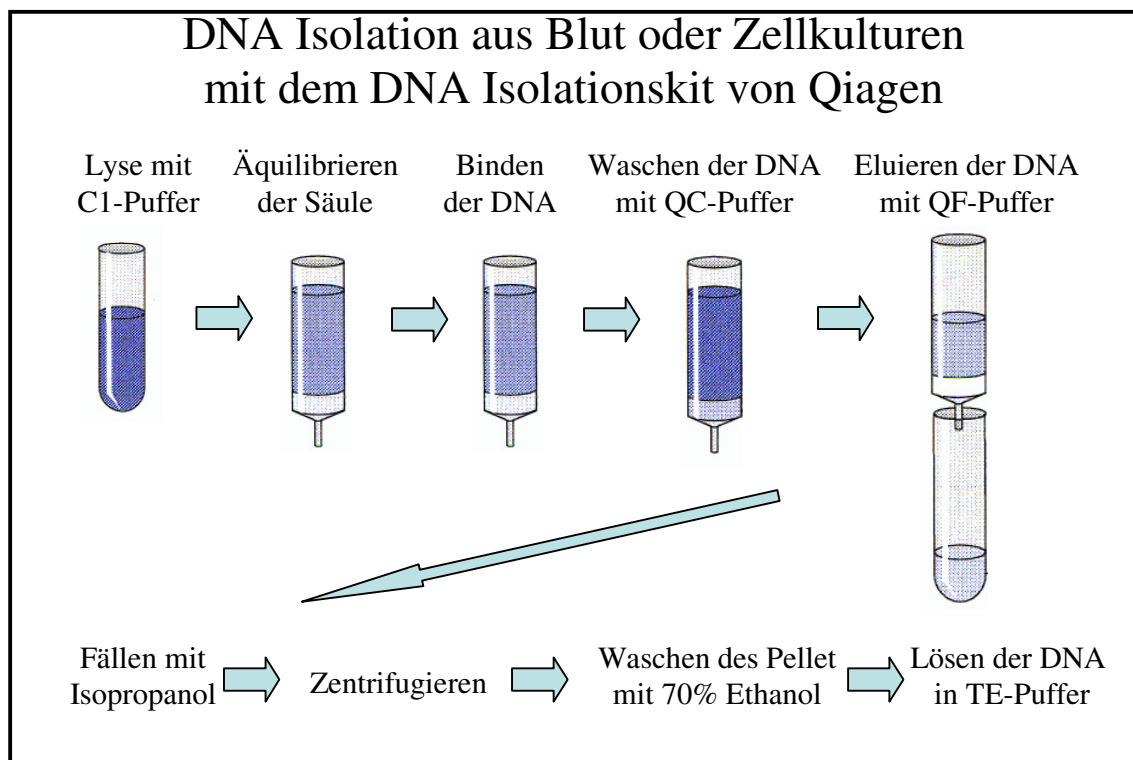


Abbildung 4: DNA Isolation mit dem Blood and Cell Culture DNA Kit, abgewandelt nach Qiagen Genomic DNA Handbook 1999.

Vor dem Einsatz der DNA in der PCR wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Durch unterschiedliche Absorption der gelösten DNA von Licht

der Wellenlänge 260 nm und 280 nm lässt sich die DNA-Konzentration der Probe mit der Warburg-Christian-Formel berechnen ($\text{DNA-Konzentration} = 62,9 \times A_{260} - 36,0 \times A_{280}$) (Warburg und Christian, 1941). Hierzu wurden 2 μl der gewonnenen DNA-Probe 1 zu 50 mit TE-Puffer verdünnt und in einer Quarzküvette im Photometer analysiert. Die Proben wurden dann durch Verdünnung mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ DNA eingestellt. Anschließend wurde je 1 μl auf einem 1%igen Agarosegel (Kapitel 2.5.) gegen 100 ng DNA aus dem Bakteriophagen λ (λ -DNA) mit einer Basenpaarlänge von 48,5 kb aufgetragen, um eventuell auftretende starke Fragmentierung der DNA auszuschließen.

Die DNA Isolation aus in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe wurde nach einer Methode nach Volkenandt et al. (1991) mit Phenol-Chloroform durchgeführt. Das Paraffin wurde durch 10 minütiges Waschen in 1 ml reinem Xylol in einem Thermomixer (60 U/min) bei Raumtemperatur, anschließendes Zentrifugieren bei 1.500 g für 5 min und durch vorsichtiges Abgießen des Überstandes entfernt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde dann zweimal mit je 1ml 96%igem Ethanol gewaschen, für 3 min bei 1.500 g zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit einem Milliliter 70%igem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 1.500 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Danach wurde das Pellet in 150 μl Digestion-Puffer resuspendiert und mit Proteinase K (Qiagen) in einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ versetzt. Darauf folgte eine Inkubation für 5 Tage bei 55°C im Thermomixer unter gelegentlichem Schwenken bei 60 U/min. Wie bei Jackson et al. (1990) beschrieben, erhöhte eine Inkubationszeit von 5 d den DNA Ertrag deutlich und verbesserte die PCR-Ergebnisse, so dass hier von den bei Volkenandt et al. (1991) beschriebenen 24 h abgewichen wurde. Anschließend erfolgte eine Phenol- Chloroform- Extraktion der DNA. Hierzu wurden 150 μl Phenol und 150 μl aus einem Gemisch von Chloroform und Isoamylalkohol in einem Verhältnis von 24 zu 1 zugefügt, für 15 s gevortext und für 2 min bei 1.500 g zentrifugiert. Anschließend konnte die obere Phase vorsichtig, ohne die in der Interphase liegende Proteinschicht zu berühren, abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Dieser Schritt musste einmal wiederholt werden. Im nächsten Schritt wurde zur Entfernung des Phenols zu dem überführten 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 Reaktionsgefäß überführt. Danach folgte

eine Ethanolfällung der DNA. Hierzu wurde jeder Probe 1/10 Volumen Natriumacetatlösung und das doppelte Volumen eiskalten, absoluten Ethanols zugesetzt. Anschließend wurde die Probe gut durchgemischt und für mindestens 1 h bei -20°C gekühlt. Die Proben wurden für 20 min bei 1.500 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig und ohne das DNA-Pellet zu berühren, entfernt. Jetzt wurde das Pellet noch zweimal mit je 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen, bei 1.500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die DNA in 200 μl TE- Puffer gelöst.

Im Gegensatz zu der DNA, die aus Blut oder Frischtumoren isoliert wurde, war die DNA aus den Paraffinschnitten extrem fragmentiert und von sehr uneinheitlicher Qualität. Durch die im Photometer gemessenen DNA-Konzentrationen konnte keine Aussage getroffen werden, ob eine PCR mit der DNA durchgeführt werden konnte oder nicht. Deshalb wurde eine Kontroll-PCR (Tabelle 2) mit nur 27 Zyklen und je 0,1 pmol/ μl β -Globin-Kontroll-Primer (Tabelle 10, Kapitel 2.7.) durchgeführt. Bei Auftreten einer β -Globinkontrollbande in der Gelelektrophorese wurde die DNA als geeignet für den Einsatz in der MASA betrachtet.

Tabelle 2: DNA-Kontroll-PCR.

Mastermix		Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Qiagen 10X PCR Puffer incl. 15 mM MgCl_2			5 μl	Mg^{2+} : 1,5 mM
Sense-Primer	β -Globin 5'	25 mM	0,2 μl	0,1 pmol/ μl
Antisense-Primer	β -Globin 3'	25 mM	0,2 μl	0,1 pmol/ μl
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 μl	200 μM
Polymerase	<i>Qia-Taq</i>	5 U/ μl	0,25 μl	1,25 U/50 μl
H_2O			Ad 49,5 μl	
Tumor-DNA			0,5 μl	10 ng/ μl
Gesamtvolumen			50 μl	

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 μl Mineralöl im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	3 min	80°C (Hot start)
27 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	65°C (Primerannealing)
	1 min	72°C (Primerelongation)
abschließend	7 min	72°C (Finale Elongation)
	Kühlung auf	$+4^{\circ}\text{C}$ (Reaktionsende)

2.5. Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge können zur Identifizierung elektrophoretisch aufgetrennt werden. Aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphatanteils der Nukleinsäuren wandern die DNA-Fragmente, je nach Größe und Konfiguration in Abhängigkeit des zu durchdringenden Mediums, im elektrischen Feld.

Zur Herstellung eines 2%igen Gels wurde 1 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer aufgekocht, 1 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt und dann in eine Form gegossen. Durch einen entfernbaren Kamm entstanden Lücken, die nach Erkalten des Gels Taschen zum Aufnehmen der Proben bildeten. Hierin wurde 1 µl der isolierten DNA mit 9 µl H₂O verdünnt oder 10 µl des Reaktionsansatzes der PCR nach Zugabe einer farbigen Schwerelösung auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer bei 10 V/cm bezogen auf die Länge des Gels im elektrischen Feld laufen gelassen. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Nach einer Stunde Laufzeit wurde das an die DNA gebundene Ethidiumbromid unter UV-Licht, bei einer Wellenlänge von 312 nm, zur Fluoreszenz angeregt und die so sichtbare DNA-Bande fotografiert. Zum Vergleich diente ein jeweils an beiden Seiten des Agarosegels mitgelaufener DNA-Längenstandard.

2.6. Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass es sich bei den für die Standardverdünnungsreihe eingesetzten Zellkulturzellen um die erwarteten Zellen und keine anderen Zellen handelte, wurde die isolierte DNA auf das Vorhandensein der jeweils zu erwartenden Mutation durch Sequenzierung untersucht. Hierzu wurde ein, in zwei PCR Schritten synthetisiertes DNA-Fragment in einer dritten Reaktion, der Kettenabbruchreaktion (Prinzip nach Sanger et al., 1977), eingesetzt.

Bei der Kettenabbruchreaktion bricht die DNA-Synthese durch die Polymerase beim Einbau von Didesoxynucleosidtriphosphat (ddNTP) statt Desoxynucleosidtriphosphat (dNTP) ab. Es werden pro Analyse vier Reaktionsansätze eingesetzt, in denen je ein dNTP zu einem geringen Anteil durch ein ddNTP ersetzt wird. Die so synthetisierte DNA weist unterschiedlichste Längen auf, an deren 3'-Ende sich pro Reaktionsansatz das gleiche Nukleotid befindet. Um die geringe Menge an DNA sichtbar zu machen, benutzten Sanger et al. (1977) radioaktiv markierte Nukleotide. In der vorliegenden Arbeit konnte auf radioaktiv markierte Nukleotide verzichtet werden, da fluoreszenzmarkierte Primer

zusammen mit einem Laserdetektionssystem eingesetzt wurden. In einer hochauflösenden Gelelektrophorese, in der DNA mit einem Längenunterschied von nur einem Nukleotid unterschieden werden kann, wurden die vier Reaktionsansätze parallel zu einander aufgetrennt und die Sequenz konnte abgelesen werden. Die Auswertung der Analyse erfolgte mit den Programmen Base Image und Li-Cor Version 4.0.

Zur Analyse wurde die DNA-Sequenz zwischen den Primern K1203 und K1204L (Tabelle 3) mit einer Länge von 299 Basenpaaren, die das Kodon 12 und 13 des *K-ras*-Gens einschließen, in einer ersten PCR, hier Cycle 1 genannt (Tabelle 4), vervielfältigt.

Tabelle 3: Primer für die PCR Cycle 1 nach Takeda et al. (1993).

Sense-Primer	K1203	5' – GTA CTG GTG GAG TAT TTG ATA GT - 3'
Genebank-Eccession-Nummer AF285779: 359-371		
Antisense-Primer	K1204L	5' – CTC ATG AAA ATG GTC AGA GAA ACC - 3'
Genebank-Eccession-Nummer AF285779: 634-657		

Tabelle 4: Reaktionsansatz der PCR Cycle 1.

Mastermix		Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR Puffer sine MgCl ₂	10X Puffer		5 µl	
Sense-Primer	K1203	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
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/50 µl
H ₂ O			ad 45 µl	
DNA aus der Tumorzelllinie SW-480 oder A-549		100 ng/µl	5 µl	10 ng/µl
Gesamtvolumen			50 µl	

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 µl Mineralöl im Thermocycler 1 unter folgenden Bedingungen:

	3 min	80°C (Hot start)
25 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	62°C (Primerannealing)
	1 min	72°C (Primerelongation)
abschließend	7 min	72°C (Finale Elongation)
	Kühlung auf + 4°C (Reaktionsende)	

In einer zweiten PCR, hier Cycle 2 genannt (Tabelle 6), wurden 0,5 µl Templet aus der ersten PCR mit so genannten „getailten“ Primern inkubiert, deren Basensequenz zum Teil identisch mit den Primern K1203 und K1204L war. Der Senseprimer (M13 rev K1203) besaß jedoch am 5'-Ende statt der ersten drei Basen ein 18 Basen langes Oligonukleotid mit bekannter Basensequenz. Der Antisenseprimer (M13 uni K1204L) besaß am 5'-Ende statt der ersten 4 Basen ein ebenfalls 18 Basen langes Oligonukleotid mit bekannter Basensequenz, dem so genannten „Tail“ (Tabelle 5).

Tabelle 5: Primer der PCR Cycle 2, abgewandelt nach Böhme et al., 1997.

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 6: Reaktionsansatz der PCR Cycle 2.

Mastermix		Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR Puffer sine MgCl ₂ 10X Puffer			5 µl	
Sense-Primer	M13 rev K1203	25 mM	1 µl	0,5 pmol/µl
Antisense-Primer	M13 univ K1204 L	25 mM	1 µl	0,5 pmol/µl
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/50 µl
H ₂ O			ad 49,5 µl	
DNA aus PCR Cycle 1		unbekannt	0,5 µl	
Gesamtvolumen			50 µl	

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 µl Mineralöl im Thermocycler 1 unter folgenden Bedingungen:

	3 min	80°C (Hot start)
3 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	62°C (Primerannealing)
	1 min	72°C (Primerelongation)
12 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	70°C (Primerannealing und Elongation)
	7 min	72°C (Finale Elongation)
abschließend	Kühlung auf	+ 4°C (Reaktionsende)

In der Kettenabbruchreaktion wurde der Primer M 13 reverse 29 eingesetzt (Tabelle 7), der mit dem „Tail“ des Sense-Primers aus der PCR Cycle 2 identisch war und an seinem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert war.

Tabelle 7: Primer der PCR Cycle T1

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

Tabelle 8: Zusammensetzung des Prämix der Kettenabbruchreaktion.

Prämix:		Stammkonzentration	Volumen
Primer	M13 reverse 29	25 mM	1 µl
DMSO			0,5 µl
DNA aus PCR Cycle 2		unbekannt	0,5 µl
H ₂ O			11 µl
Gesamtvolumen			13 µl

Vier Reaktionsansätze mit je 3 µl Prämix (Tabelle 8) und 1 µl Thermostase (von Amersham vorgefertigte Lösung mit DNA-Polymerase, Puffer, dNTP und ddNTP), jeweils mit einem der vier möglichen ddNTP, inkubierten nach Überlagerung mit 20 µl PCR-Wachs im Thermocycler 1 unter folgenden Bedingungen:

	1 min 45s	95°C (Hot start)
12 Zyklen	15 s	95°C (Denaturierung)
	15 s	55°C (Primerannealing)
	15 s	70°C (Primerelongation)
13 Zyklen	20 s	95°C (Denaturierung)
	20 s	55°C (Primerannealing)
	20 s	70°C (Elongation)
abschließend	40 s	95°C (Denaturierung)
	Kühlung auf + 4°C (Reaktionsende)	

Zu den Reaktionsansätzen wurden je 3 µl Stop/Loading Buffer zugemischt und davon 1 µl PCR-Produkt pro Tasche auf einem 41cm langen Sequenziergel aufgetragen und bei 1500 V und 50°C in TBE-Puffer für 3-4 h im Sequenzierer analysiert.

2.7. MASA-Polymerasekettenreaktion

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die von Kwok und Higuchi (1989) beschriebenen Sicherheitsstandards für Polymerasekettenreaktionen soweit wie möglich eingehalten. Die DNA-Isolation, die Proben und die PCR-Reagenzien wurden räumlich voneinander getrennt. Es wurde unter einer Sterilbank mit laminarer Luftströmung gearbeitet, alle Reagenzien wurden, wenn möglich, autoklaviert. Es wurden Einweghandschuhe getragen, die regelmäßig gewechselt wurden. Die benutzten Proben- und Reagenzgefäße ließen sich ohne die Gefahr von Aerosolkontaminationen öffnen und es wurden alle Pipettierschritte mit DNase freien Filtertips durchgeführt. Puffer, Sense- und Antisenseprimer, Kontrollprimer (β -Globin Sense- und Antisenseprimer), dNTP, $MgCl_2$ und *Taq*-Polymerase wurden in einem Mastermix vorpipettiert und dann aliquotiert. Als interne Positivkontrolle wurden β -Globinkontrollprimer (Tabelle 10) eingesetzt, um die erfolgreiche PCR-Reaktion zu dokumentieren. Der verwendete β -Globingenabschnitt ist eine, in allen menschlichen Zellen vorkommende DNA-Sequenz, die häufig als Positivkontrolle einer PCR benutzt wird (Losi et al., 1992). Die Templet-DNA wurde als letztes zum Reaktionsansatz hinzupipettiert, so dass das Gesamtvolumen 50 µl betrug. Jeder MASA wurde als Templet je eine Negativkontrolle und, soweit vorhanden, eine Positivkontrolle mitgegeben. Das PCR-Produkt wurde dann auf einem Agarosegel

aufgetrennt, das an die DNA gebundene Ethidiumbromid unter UV-Licht bei einer Wellenlänge bei 312 nm zur Fluoreszenz angeregt und die DNA-Bande fotografiert (Kapitel 2.5.). Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten wurden im weiteren Verlauf zur Optimierung der PCR variiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsschritte bei + 4°C durchgeführt.

Die für die MASA eingesetzten Primer wurden in der in Tabelle 9 angegebenen Sequenz synthetisiert. Entscheidend ist die unterschiedliche Base am 3'-Ende bei den Sense-Primern. Da die Synthese vom 3'-Ende begonnen wurde, sind trotz gelegentlicher Syntheseabbrüche an dieser Position Synthesefehler extrem unwahrscheinlich. Zusätzlich wurden die Primer über eine Hochdruckflüssigchromatographie gereinigt, um Oligonukleotide anderer Länge zu entfernen. In der Gruppe der Primer SET 1 sind Primer für die Untersuchung der ersten Position, in der Gruppe SET 2 für die zweite Position im Kodon 12 und in der Gruppe SET 3 für die erste und zweite Position im Kodon 13 zusammengefasst.

Tabelle 9: SET 1, SET 2 und Antisense-Primer nach Takeda et al. (1993), SET 3 abgewandelt nach Losi et al. (1992).

Sense-Primer				
Benennung	Kodon	Mutation	Aminosäure 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*	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*	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'			

*MASA-Primer SET 3 TA und SET 3 TG wurden nach der Optimierung der PCR nicht in die MASA eingesetzt. (Genebank-Eccession-Nummer der Primer des SET 1: 468 – 487, SET 2: 469 – 488, SET 3 TA und TC: 471 – 490, SET 3 GA 472 – 491 und K1204L: 624 – 647.)

Bei Einsatz der Sense-Primer SET 1 war das MASA-Produkt 179 bp, bei den Primern SET 2 178 bp, SET 3 TA und TC 176 bp und dem Primer SET 3 GA 175 bp lang. Das PCR-Produkt der β -Globin-Primer war 268 Basenpaare lang.

Tabelle 10: β -Globinkontrollprimer nach Losi et al. (1992).

Sense-Primer	β -Globin 5'	5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC - 3'
Genebank-Eccession-Nummer: AY 260740, 72-91		
Antisense-Primer	β -Globin 3'	5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC - 3'
Genebank-Eccession-Nummer: AY 260740, 320-339		

2.7.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die PCR-Bedingungen müssen so gewählt werden, dass nur bei komplementärer DNA zum Primer eine Hybridisierung und anschließende DNA-Synthese erfolgt. Anders gesagt, darf es bei einem Basenmismatch am 3'-Ende des Primers nicht zu einer DNA-Synthese kommen. Am stärksten wird dies durch die Wahl der Hybridisierungstemperatur, der Magnesiumionen-, Primer- und Nukleotidkonzentration im Reaktionsgemisch, der Dauer der einzelnen Zyklusabschnitte und der Zyklenanzahl beeinflusst. Außerdem können weitere Zusätze des Reaktionsgemisches (Ammoniumionen) und unterschiedliche DNA-Polymerasen dieses Gleichgewicht beeinflussen (Harris und Jones, 1997). Im Folgenden wurden diese Einflussgrößen variiert, um die optimalen Bedingungen herauszufinden.

2.7.1.1. Variation der Annealingtemperatur, Zyklenzahl und Magnesiumionen-konzentration

Ausgehend von einem Standardprotokoll aus der Literatur (Takeda et al., 1993; Hayashi et al., 1994) und eigenen Vorversuchen wurden die in Tabelle 11 aufgelisteten Konzentrationen nicht variiert. Die Zyklenzahl wurde in Zwischenschritten von 28 bis 32 Zyklen, die Annealingtemperatur in zwei Grad Celsius Schritten von 61°C bis 67°C und die MgCl₂-Konzentration mit 1 mM, 1,5 mM und 2 mM variiert. Als Referenz-DNA wurde die der Verdünnungsreihe der Tumorzelllinie SW-480 in Probandenblut eingesetzt (Kapitel 2.3.). Als Primer wurde der zur Mutation im Kodon 12 von GGT zu GTT

komplementäre Primer SET 2 GT eingesetzt. Für jede PCR wurde ein Reaktionsansatz mit einer der drei verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentration eingesetzt. Für die Variation der Zyklenzahl und der Annealingtemperatur musste je eine neue PCR-Reaktion gestartet werden.

Tabelle 11: Reaktionsansatz der MASA mit variabler $MgCl_2$ -Konzentration.

Mastermix		Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR Puffer sine $MgCl_2$ 10X Puffer			5 μ l	
Sense-Primer	SET 2 GT	25 mM	2 μ l	1 pmol/ μ l
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 μ l	1 pmol/ μ l
Kontrollprimer	β -Globin 5'	25 mM	0,2 μ l	0,1 pmol/ μ l
	β -Globin 3'	25 mM	0,2 μ l	0,1 pmol/ μ l
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/50 μ l
H ₂ O			ad 45 μ l	
DNA aus der Verdünnungsreihe SW-480		100 ng/ μ l	5 μ l	10 ng/ μ l
Gesamtvolumen			50 μ l	

Wie oben beschrieben, wurde ein Mastermix hergestellt und nach Aliquotierung die Templet-DNA hinzupipettiert. Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 μ l Mineralöl im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	3 min	80°C (Hot start)
28 , 30 oder 32 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	61, 63, 65 oder 67°C (Primerannealing)
	1 min	72°C (Primerelongation)
abschließend	7 min	72°C (Finale Elongation)
	Kühlung auf + 4°C (Reaktionsende)	

Jedes Ergebnis wurde zur Verifizierung einmal mit einer zweiten Verdünnungsreihe reproduziert. Dies gilt auch für die folgenden Versuche in diesem Kapitel. Da die Versuche zum Teil aufeinander aufbauten, werden in den folgenden Abschnitten Ergebnisse vorweggenommen, die der Übersicht halber erst im Ergebnisteil Kapitel 3. erwähnt werden.

2.7.1.2. Variation der dNTP-Konzentration

Um die Nachweisgrenze weiter zu steigern, wurde unter den optimierten PCR-Bedingungen die zuvor bei 200 μM konstant gehaltene dNTP Konzentration in drei Reaktionsansätzen mit 50 μM , 100 μM und 200 μM variiert (Tabelle 12). Zu erwarten ist, dass bei niedriger Nukleotidkonzentration die Wahrscheinlichkeit eines Basenmismatches durch Einbau eines falschen Nukleotids geringer ist (Losi et al., 1996; Rhodes et al., 1997). Um die Möglichkeit einer Steigerung der unteren Nachweisgrenze auszuloten, wurde die Zyklenzahl bis zum Erreichen einer unspezifischen Reaktion gesteigert.

Tabelle 12: Reaktionsansatz der MASA mit variabler dNTP-Konzentration.

Mastermix		Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR Puffer sine MgCl_2	10X Puffer		5 μl	
Sense-Primer	SET 2 GT	25 mM	2 μl	1 pmol/ μl
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 μl	1 pmol/ μl
Kontrollprimer	β -Globin 5'	25 mM	0,2 μl	0,1 pmol/ μl
	β -Globin 3'	25 mM	0,2 μl	0,1 pmol/ μl
Nukleotide	dNTP	10 mM	variabel: 50, 100 und 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/50 μl
H_2O			ad 45 μl	
DNA aus der Verdünnungsreihe SW-480		100 ng/ μl	5 μl	10 ng/ μl
Gesamtvolumen			50 μl	

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 μl Mineralöl im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	3 min	80°C (Hot start)
30, 31 oder 32 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	65°C (Primerannealing)
	1 min	72°C (Primerelongation)
abschließend	7min	72°C (Finale Elongation)
	Kühlung auf	+ 4°C (Reaktionsende)

2.7.1.3 Variation der eingesetzten DNA-Menge

Einige Autoren setzten in der MASA definierte Mengen an DNA ein (Watanabe et al., 1999), andere ein festgesetztes Volumen einer DNA-Lösung unbekannter Konzentration (Losi et al., 1992). Je größer die eingesetzte DNA-Menge ist, desto größer ist auch die Anzahl der vorhandenen mutierten DNA-Anteile. Ob eine größere Menge an Wildtyp-DNA einen negativen Einfluss auf die Spezifität hat, sollte durch die Variation der DNA-Konzentration mit 1 ng/μl, 10 ng/μl und 40 ng/μl Reaktionsansatz geklärt werden (Tabelle 13). Beginnend bei 29 Zyklen wurde die Zyklenzahl bis zum Erreichen eines falsch-positiven Ergebnisses gesteigert.

Tabelle 13: Reaktionsansatz der MASA mit variabler DNA-Konzentration.

Mastermix		Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR Puffer sine MgCl ₂	10X Puffer		5 μl	
Sense-Primer	SET 2 GT	25 mM	2 μl	1 pmol/μl
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 μl	1 pmol/μl
Kontrollprimer	β-Globin 5'	25 mM	0,2 μl	0,1 pmol/μl
	β-Globin 3'	25 mM	0,2 μl	0,1 pmol/μl
Nukleotide	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/50 μl
H ₂ O			Ad 45 μl	
DNA aus der Verdünnungsreihe SW-480		100 ng/μl	variabel: 1, 10, 40 ng/μl	
Gesamtvolumen			50 μl	

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 μl Mineralöl im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	3 min	80°C (Hot start)
29, 30 oder 31 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	65°C (Primerannealing)
	1 min	72°C (Primerelongation)
abschließend	7 min	72°C (Finale Elongation)
	Kühlung auf	+ 4°C (Reaktionsende)

2.7.1.4. Vergleich der DNA-Polymerasen

Entscheidend für den Erfolg einer PCR ist die Polymerase, die die DNA-Synthese aus Nukleotiden durchführt. Es werden ausschließlich thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt, so dass sie auch nach der DNA-Denaturierung bei 95°C noch Aktivität zeigen. Standard-Polymerase ist die *Taq*-Polymerase, isoliert aus *Thermus aquaticus*, mit einem Molekulargewicht von 94 kDa. Sie besitzt keine 3' oder 5' Exonukleaseaktivität, das heißt, sie baut DNA, z.B. Primer, weder vom 3'-, noch vom 5'-Ende ab. So kann sie aber auch keine Synthesefehler korrigieren. Solche Synthesefehler treten mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 zu 400 auf (Losi et al., 1992). Die in *Escherichia coli* synthetisierte, rekombinante Polymerase Ampli-*Taq*-Stoffelfragment synthetisiert DNA-Stränge mit einem Basenpaarmismatch deutlich seltener als *Taq*-Polymerase (Chen and Zarbl, 1997). Zusätzlich besitzt sie eine 5'-Exonukleaseaktivität, aber keine 3'-Exonucleaseaktivität. Die Qia-*Taq*-Polymerase (*Qiagen*) entspricht der *Taq*-Polymerase, wird aber nicht aus *Thermus aquaticus* isoliert, sondern in *E. coli* rekombinant hergestellt. Der Hersteller liefert sie mit einem 10X PCR-Puffer, im folgenden Qia 10X PCR-Puffer, mit dem unspezifische Hybridisierungen durch den Zusatz von Ammoniumionen deutlich reduziert werden sollen (Tabelle 14). Außerdem enthält der Puffer Magnesiumchlorid in einer Konzentration von 15 mM. Die Zyklenzahl wurde wie in Kapitel 2.7.1.3. bis zu einem falsch-positiven Ergebnis gesteigert.

Tabelle 14: Reaktionsansatz der MASA mit variierten DNA-Polymerasen.

Mastermix		Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR Puffer sine MgCl ₂ * 10X Puffer			5 µl	
Sense-Primer	SET 2 GT	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
Kontrollprimer	β-Globin 5'	25 mM	0,2 µl	0,1 pmol/µl
	β-Globin 3'	25 mM	0,2 µl	0,1 pmol/µl
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Magnesiumchlorid*	MgCl ₂	50 mM	1,5 µl	1,5 mM
Variation der Polymerase		5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/50 µl
H ₂ O			Ad 45 µl	
DNA aus der Verdünnungsreihe SW-480		100 ng/µl	5 µl	10 ng/µl
Gesamtvolumen			50 µl	

*Beim Einsatz der *Qia-Taq* Polymerase wurde der mitgelieferte 10X PCR Puffer mit zugesetztem Magnesiumchlorid eingesetzt, so dass die MgCl₂-Endkonzentration 1,5 mM betrug.

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 µl Mineralöl im Thermocycler unter den Bedingungen wie in Kapitel 2.7.1.3. beschrieben.

2.7.1.5. Einfluss der β-Globin-Kontrollprimer auf die optimierte MASA

Durch den Kontrollprimer soll nur die erfolgreich abgelaufene PCR dokumentiert werden, weder Sensitivität noch Spezifität der MASA soll beeinflusst werden. Um die, durch den Einsatz der β-Globin-Primer synthetisierte DNA-Bande in der Agarosegelelektrophorese möglichst schwach zu halten, wurde die β-Globin-Primerkonzentration von Anfang an auf ein Zehntel der MASA-Primerkonzentration reduziert.

In einer MASA wurde nun auf den Einsatz der β-Globin Primer verzichtet und das Ergebnis mit einer parallellaufenden MASA mit β-Globin verglichen. Das Reaktionsprotokoll war sonst dem in Kapitel 2.7.1.3. beschriebenen mit *Taq*-Polymerase und 30 Zyklen identisch.

2.7.1.6 Nested-PCR

Die Nested-PCR besteht aus zwei aufeinander folgenden Polymerasekettenreaktionen. Während man die erste PCR nach üblichem Protokoll durchführt, wird bei der zweiten PCR das stark verdünnte Produkt aus der ersten PCR als Templet genutzt. Die jetzt eingesetzten Primer hybridisieren innerhalb der in der ersten PCR synthetisierten DNA. Durch dieses Verfahren wird die zu untersuchende DNA überwiegend von der Rest-DNA getrennt eingesetzt. So ist ein spezifischeres Produkt zu erwarten. Wird einer der beiden Primer aus der ersten PCR in der zweiten PCR erneut eingesetzt, so spricht man von einer Semi-nested PCR (*Taq* PCR Handbook 1997). Dabei ist zu bedenken, dass bei der DNA-Synthese durch die *Taq*-Polymerase falsche Nukleotide mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 zu 400 eingebaut werden. Ein an der Stelle einer zu untersuchenden *K-ras*-Punktmutation eingebautes Nukleotid würde zu einem falsch positiven Ergebnis führen (Losi et al., 1992). Der erste Schritt der Nested-PCR wurde daher mit den, das Kodon 12 und 13 einschließenden, Primern K1203 und K1204L (Tabelle 3) mit der *Pfu*-Polymerase durchgeführt (Tabelle 15). Die *Pfu*-Polymerase, eine 92 kDa schwere, aus *Pyrococcus furiosus* isolierte DNA-Polymerase, besitzt eine 3'-Exonukleaseaktivität, eine so genannte „Proofreadingaktivität“. Ihre Fehlerquote bei der DNA-Synthese ist damit deutlich geringer als die der *Taq*-Polymerase. So entstand ein 268 bp langes DNA-Fragment.

Tabelle 15: Reaktionsansatz der Nested-PCR Teil 1.

Mastermix		Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Promega 10X PCR Puffer incl. 20 mM MgSO₄			5 µl	Mg²⁺: 2 mM
Sense-Primer	K1203	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Polymerase	<i>Pfu</i>-Polymerase	5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/50 µl
H ₂ O			Ad 45 µl	
DNA aus der Verdünnungsreihe SW-480		100 ng/µl	5 µl	10 ng/µl
Gesamtvolumen			50 µl	

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 µl Mineralöl im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	3 min	80°C (Hot start)
25 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	62°C (Primerannealing)
	1 min	72°C (Primerelongation)
abschließend	7 min	72°C (Finale Elongation)
	Kühlung auf	+ 4°C (Reaktionsende)

Im zweiten Schritt der Nested-PCR, der MASA, wurden dann 0,5 µl des 1 zu 10 mit TE-Puffer verdünnten Reaktionsansatzes aus dem ersten Schritt als Templet eingesetzt. Die niedrigste Nachweisgrenze wurde, wie in Kapitel 2.7.1.3., durch die Erhöhung der Zyklenzahl um einen Zyklus, ausgehend von 28, bis zum Erreichen eines falsch-positiven Ergebnisses bestimmt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Reaktionsansatz der Nested-PCR Teil 2.

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

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 µl Mineralöl im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	3 min	80°C (Hot start)
20 –25 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	65°C (Primerannealing)
	1 min	72°C (Primerelongation)
abschließend	7 min	72°C (Finale Elongation)
	Kühlung auf	+ 4°C (Reaktionsende)

2.7.2. „Multiplex allel specific PCR“

Um die Anzahl der durchzuführenden PCR zu reduzieren, führten Losi et al. (1992) zunächst je drei Reaktionen mit einem Gemisch von Senseprimern für die Analyse der ersten Position im Kodon 12, der zweiten Position im Kodon 12 und der ersten und zweiten Position im Kodon 13 durch. Bei positivem Signal in der Gelelektrophorese wurden dann drei MASA mit je einem der Sense-Primer durchgeführt, um die Mutation im *K-ras*-Gen zu identifizieren. Ob eine eventuelle Interaktion zwischen den, bis auf ein oder zwei (SET 3) Basen identischen Sense-Primern, die Sensitivität oder Spezifität beeinflusst, wurde unter den in Kapitel 2.6.1. optimierten Bedingungen mit den drei Primern des SET 2 und der Verdünnungsreihe von SW-480 Zellen getestet (Tabelle 17).

Tabelle 17: Reaktionsansatz der Multiplex allel specific PCR

Mastermix		Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Qiagen10 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 pmol/µl
	SET 2 GC	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
	SET 2 GA	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
Kontrollprimer	β-Globin 5'	25 mM	0,2 µl	0,1 pmol/µl
	β-Globin 3'	25 mM	0,2 µl	0,1 pmol/µl
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Polymerase	Qia-Taq	5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/50 µl
H ₂ O			Ad 45 µl	
DNA aus der Verdünnungsreihe SW-480		100 ng/µl	5 µl	10 ng/µl
Gesamtvolumen			50 µl	

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 µl Mineralöl im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	3 min	80°C (Hot start)
31 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	65°C (Primerannealing)
	1 min	72°C (Primerelongation)
abschließend	7 min	72°C (Finale Elongation)
	Kühlung auf	+ 4°C (Reaktionsende)

2.7.3. Optimierung der Reaktionsbedingungen für die übrigen Primer

Die in den Kapiteln 2.6.1. und 2.6.2. beschriebenen Versuche wurden ausschließlich mit dem Primer SET 2 GT und einer Verdünnungsreihe von *SW-480* Zellen in Blut durchgeführt. Da die Bindungsenergien bei den einzelnen Basenpaarungen unterschiedlich stark sind, kann man die Bedingungen dieser Versuche nicht ohne weiteres auf die anderen Primer und *K-ras*-Mutationen übertragen (Kidd et al., 1983). Deshalb wurden die optimierten MASA-Bedingungen aus Kapitel 2.6.1. mit dem Primer SET 1 TA und der Verdünnungsreihe von *A-549* Zellen im Blut wiederholt. Wie zuvor wurde mit einer Zyklenzahl von 28 begonnen, die bis zum Erreichen eines unspezifischen Ergebnisses gesteigert wurde. Da für die anderen Primer keine Zelllinie mit entsprechender *K-ras*-Mutation vorhanden war, wurde die MASA jeweils mit beiden Verdünnungsreihen und den übrigen Senseprimern durchgeführt (Tabelle 18). Bei falsch positiven Reaktionen wurde die Zyklenzahl bis auf 29 Zyklen reduziert oder aber die Annealingtemperatur in 1°C Schritten von 65°C auf 67°C angehoben.

Tabelle 18: Reaktionsansatz der MASA für die verschiedenen Sense-Primer aus Tabelle 8 mit DNA aus der Verdünnungsreihe von *SW-480* oder *A-549* Zellen.

Mastermix		Stammkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Qiagen 10X PCR Puffer incl. 15mM MgCl ₂			5 µl	Mg ²⁺ : 1,5 mM
Sense-Primer	Laut Tabelle 8	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
Antisense-Primer	K1204 L	25 mM	2 µl	1 pmol/µl
Kontrollprimer	β-Globin 5'	25 mM	0,2 µl	0,1 pmol/µl
	β-Globin 3'	25 mM	0,2 µl	0,1 pmol/µl
Nukleotide	dNTP	10 mM	1 µl	200 µM
Polymerase	<i>Qia-Taq</i>	5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/50 µl
H ₂ O			Ad 45 µl	
DNA aus der Verdünnungsreihe von <i>SW-480</i> oder <i>A-549</i> in Blut		100 ng/µl	5 µl	10 ng/µl
Gesamtvolumen			50 µl	

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 µl Mineralöl im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	3 min	80°C (Hot start)
29, 30 oder 31 Zyklen	0.5 min	95°C (Denaturierung)
	1,5 min	65, 66 oder 67°C (Primerannealing)
	1 min	72°C (Primerelongation)
abschließend	7 min	72°C (Finale Elongation)
	Kühlung auf	+ 4°C (Reaktionsende)

2.8. Patienten

In die Studie wurden Patienten eingeschlossen, die zwischen März 1997 und November 1999 an einem histologisch gesicherten kolorektalen Karzinom oder unter dem hochgradigen Verdacht eines kolorektalen Karzinoms in der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, kurativ oder palliativ operiert wurden. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Zweit- oder Rezidivkarzinom in der Anamnese. Als Kontrollgruppe dienten 27 Patienten, die sich auf Grund eines Bauchortenaneurysmas einem großen Baucheingriff unterzogen. Alle Patienten wurden mündlich und schriftlich ausführlich über den Sinn und die Risiken der Teilnahme an dieser Studie aufgeklärt und nahmen nur nach schriftlicher Einwilligung teil. Eine Zustimmung durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität zu Lübeck lag vor (Nr. AZ 97-042, Zustimmung erteilt am 21.05.1997).

Von 92 Patienten, die unter dem Verdacht eines kolorektalen Karzinoms operiert wurden, konnten präoperative Blutproben gesammelt werden. 12 Patienten wurden auf Grund der Ausschlusskriterien nachträglich herausgenommen. Davon wiesen 10 Patienten kein Karzinom auf, von zwei Patienten konnte kein Tumormaterial für die Studie gewonnen werden (ein kleines Karzinom und ein inoperabler Tumor). Weitere fünf Patienten wurden ausgeschlossen, da aus den vorhandenen Paraffinschnitten keine PCR-taugliche DNA isoliert werden konnte. Das Patientenkollektiv umfasste also 74 Patienten mit kolorektalem Karzinom und einen Patienten mit einem Polypen mit schwerer Dysplasie. Die Altersspanne reichte von 36 bis 84 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 67 Jahre und der Median lag bei 68 Jahren (ausführliche Auflistung der Patientendaten in Kapitel 9). Die Verteilung der Tumorstadien der 74 kolorektalen Karzinome sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Häufigkeitsverteilung der Tumorstadien.

Tumorstadium*	Anzahl	Prozent
I	20	27
II	27	36
III	15	20
IV	12	16

*nach UICC (Hermanek et al., 1992)

Die Nachbeobachtung der Patienten mit kolorektalem Karzinom erfolgte entweder während der regelmäßigen Nachsorge in der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, durch jährliche Befragung der Hausärzte oder bei Hausarztwechsel über direkte Briefbefragung der Patienten. Patienten, die der Nachbeobachtung, z.B. durch Nichtbeantwortung des Fragebogens entgingen, wurden nicht mehr in die weitere Nachbeobachtung einbezogen.

2.9. Frischtumorproben

Das Operationsresektat wurde direkt nach der Entfernung in das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck gebracht. Dort wurde ein Gewebestück, das makroskopisch sicher als Tumor imponierte, durch einen erfahrenen Pathologen entnommen. Das Tumorstück wurde sofort in Kryogefäße zur weiteren Konservierung überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung in der Tumorbank des Chirurgischen Forschungslabors des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.10. Herstellung von Hämatoxylin-Eosin-Präparaten zur histologischen Untersuchung der Frischtumorproben

Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem untersuchten Gewebe um Karzinomgewebe handelte und der Anteil von Karzinomzellen zu Nichtkarzinomzellen nicht geringer als 80% war, wurde jeweils ein Hämatoxylin-Eosin-Präparat angefertigt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Hierzu wurde ein kleiner Teil der Frischtumorprobe in Paraffin gebettet. Nach Anfertigung von 4 µm dünnen Schnitten mit einem Mikrotom, wurde das Präparat, wie bei Chang (1972) beschrieben, einer HE-Färbung unterzogen.

2.11. Paraffintumorproben

Von Tumoren, von denen kein Frischgewebe für die Tumorbank gewonnen werden konnte (z.B. ein kleiner Tumor, der zunächst komplett im Institut für Pathologie verbleiben musste), wurde das in Paraffin eingebettete Tumorgewebe weiterverarbeitet. Es wurde, wie in Kapitel 2.10. beschrieben, ein HE-Präparat angefertigt und ebenfalls unter dem Mikroskop begutachtet.

Für die DNA-Isolierung wurde das überstehende Paraffin mit einem Skalpell entfernt und mit einem Mikrotom 10 µm dünne Schnitte angefertigt. Je drei Schnitte eines Tumors wurden dann in 2 ml Eppendorf-Tubes überführt und bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde die Mikrotomklinge nach jeder Probe ausgiebig mit Alkohol gereinigt, ebenso wurde das Skalpell gereinigt, bzw. durch ein neues ersetzt.

2.12. Analyse der Tumor-DNA mit der MASA

DNA wurde aus 23 Frischtumoren und 38 Paraffinblöcken isoliert. Zusätzlich lagen 14 DNA-Proben sowohl aus Frischgewebe als auch aus Paraffin isoliert vor. Die Analyse auf *K-ras*-Mutationen erfolgte unter den in Kapitel 3.1.9. angegebenen optimierten MASA Bedingungen. Jede Reaktion wurde insgesamt dreimal wiederholt.

2.13. Sequenzierung der Tumor-DNA zum Nachweis von *K-ras*-Mutationen

Um die Zuverlässigkeit der MASA zum Nachweis von *K-ras*-Mutationen zu überprüfen, wurde die DNA von 14 zufällig ausgesuchten Frischtumorproben und 14 DNA-Proben die aus Paraffintumoren isoliert wurde, wie in Kapitel 2.6. beschrieben, sequenziert. Da in dem DNA-Isolat ein Tumoranteil von mindestens 80% (Kapitel 2.10.) enthalten und die Mutation im *K-ras*-Gen auch heterozygot sein konnte, lag das Verhältnis von mutierter DNA zu Wildtyp-DNA bis 1 zu 4. Zum Vergleich wurde eine Verdünnung von SW-480 Zellen in Blut (Kapitel 2.3.) sequenziert, um zu überprüfen, bis zu welchem Konzentrationsverhältnis von Tumor-DNA zu Wildtyp-DNA eine Mutation festzustellen

war. Das Verhältnis von *SW-480* Zellen zu kernhaltigen Zellen im Blut betrug 1 zu 1, 1 zu 5 und 1 zu 10. Die Sequenzierung wurde zum einen über die Basensequenz in der Gelelektrophorese, als auch mit der digitalen Analyse, wie in Kapitel 2.6. beschrieben, ausgewertet.

2.14. „Temporal Temperature Gradient Gelelektrophoresis“ (TTGE) der Tumor-DNA zum Nachweis von *K-ras*-Mutationen

30 zufällig ausgesuchte Frischtumorproben wurden zusätzlich mit Hilfe der „Temporal Temperature Gradient Gelelektrophoresis“ (TTGE) auf das Vorhandensein von *K-ras*-Mutationen untersucht. Bei der von Andersen und Borresen (1995) beschriebenen TTGE kann man DNA identischer Länge aus einer PCR nur auf Grund eines unterschiedlichen Basenpaares (Punktmutation) in einem Polyacrylamidgel auftrennen. Hierbei macht man sich zu Nutzen, dass die doppelsträngige DNA in Anwesenheit von Harnstoff als Denaturans bei steigender Temperatur in Anwesenheit von Punktmutationen unterschiedlich schnell schmilzt. So weist mutierte DNA ein anderes Laufverhalten als Wildtyp-DNA auf. Das Ergebnis ist dann in dem unterschiedlichen Bandenmuster abzulesen. Homozygote Proben weisen nur eine Bande aus den beiden Einzelsträngen der Homoduplex auf. Bei heterozygoter DNA und einer Mischung aus Wildtyp- und mutierter DNA entstehen aufgrund der unterschiedlichen Hybridisierungsmöglichkeiten vier Banden. Zwei Banden stellen die jeweiligen Homoduplexe und zwei Banden die jeweiligen Heteroduplexe dar. Eine Heteroduplex besteht dabei aus der Kombination Wildtyp- (Sensestrang) und mutierter DNA (Antisensestrang), die andere aus der Kombination aus Wildtyp- (Antisensestrang) und mutierter DNA (Sensestrang). Zunächst wurde der DNA-Abschnitt, der das *K-ras*-Kodon 12 und 13 trägt, in einer PCR, wie im ersten Schritt der Nested PCR beschrieben, mit den Primern K1203 und K1204L (Tabelle 3) amplifiziert. Dann wurden 9 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Schwerelösung in die Taschen des Polyacrylamidgels aufgetragen und in der TTGE-Kammer in Laufpuffer aufgetrennt. Optimale Bedingungen wurden erreicht bei 160 V, einer Anfangstemperatur von 53°C, einer Endtemperatur von 63°C und einer Temperaturerhöhung (ramp rate) von 2°C/h. Dies entspricht einer Laufzeit von 5 h.

Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Polyacrylamidgel, wie bei Rosenbaum und Riesner (1987) beschrieben, modifiziert nach Menke et al. (1995), einer Silberfärbung unterzogen:

Fixierung:	dreimal 5 min in Fixierlösung
Silberimpregnierung:	einmal 15 min Silbernitratlösung
Differenzierung:	zweimal 2 s H ₂ O
Entwicklung:	zweimal kurz spülen, dann je 3 min, 5 min, 12 min in Entwicklerlösung inkubieren
Nachentwicklung:	einmal 5 min in Nachentwickler und anschließend mit H ₂ O waschen

Anschließend wurde das Gel in eine Folie eingeschweißt und zur Dokumentation eingescannt.

2.15. Blutproben

Unmittelbar vor Operationsbeginn wurden 20 ml Blut mit zwei Ammoniumheparin-Monovetten über einen zentralen Venenkatheter abgenommen. Das Lumen wurde vorher mit 20 ml isotonischer Kochsalzlösung gespült und 10 ml Blut aspiriert und verworfen. Nach der Blutentnahme wurde das Lumen mit isotonischer Kochsalzlösung gespült, um ein Verstopfen des ZVK zu verhindern. Die Proben wurden umgehend auf Eis gelagert, dann bei -20°C tief gefroren und innerhalb von 12 Wochen verarbeitet.

Die DNA wurde, wie in Kapitel 2.4. beschrieben, mit dem DNA-Blood and Cell Culture Kit (Qiagen) isoliert, auf 100 ng DNA /µl mit TE-Puffer eingestellt und in der Agarosegelelektrophorese, wie in Kapitel 2.5. beschrieben, auf Fragmentierung untersucht.

2.16. Analyse der Blutproben mit der MASA

Zur Identifizierung von disseminierten Tumorzellen im Blut wurde die aus Blut isolierte DNA bei den Patienten, deren Tumor eine *K-ras*-Mutation besaß, unter den in Abschnitt 3.1.10. aufgeführten Versuchsbedingungen auf das Vorhandensein dieser *K-ras*-Mutationen hin untersucht. Zehn zufällig ausgesuchte Blut-DNA-Proben von Patienten, deren Tumoren keine *K-ras*-Mutation aufwies, wurden mit allen sieben MASA-Primern (Tabelle 9) auf *K-ras*-Mutationen untersucht. Auch hier wurde die Reaktion dreimal wiederholt. Jedem Reaktionsansatz wurde, soweit vorhanden, eine Positivkontrolle einer

Verdünnungsreihe von 10^2 Tumorzellen pro Milliliter Blut zugegeben, deren Mutation dem eingesetzten MASA-Primer entsprach.

2.17. Analyse der Kontrollgruppenproben mit der MASA

Die 27 Blutproben der Kontrollgruppe stammten von Patienten, die sich zwischen März 1997 und Juni 1998 an einem Bauchaortenaneurysma operieren ließen. Die Altersspanne lag zwischen 55 und 79 Jahren, im Median 72 Jahre. Die aus dem Blut isolierten DNA-Proben wurden mit den sieben MASA-Primern (Tabelle 9) unter den in Kapitel 3.1.10. angegebenen Bedingungen auf *K-ras*-Mutationen untersucht. Jede Reaktion wurde drei Mal wiederholt.

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der MASA

An Hand der digitalisierten Bilder der Gelelektrophoresen der verschiedenen PCR-Produkte wurden die Ergebnisse der Optimierung der MASA verglichen. Eine Bande in der Gelelektrophorese auf der Höhe der DNA-Fragmente von 176 bp, 178 bp bzw. 179 bp Länge, je nach verwendetem Primer, wurde als spezifisch für den Nachweis einer *K-ras*-Mutation gewertet, wenn auch die β -Globinkontrollbande bei 268 bp sichtbar war. Eine sehr schwache DNA-Bande bei der Blutprobe und der Negativkontrolle wurden immer als das Ergebnis einer unspezifischen Reaktion gewertet. Jedes Ergebnis wurde mindestens ein Mal reproduziert.

3.1.1. Variation der Temperatur, Zyklenzahl und Magnesiumionenkonzentration

Grundsätzlich ist zu erwarten, dass die Spezifität der Primerhybridisierung mit sinkender Temperatur, steigender Zyklenzahl und steigender Magnesiumionenkonzentration abnimmt, das heißt, die Wahrscheinlichkeit von falsch positiven Ergebnissen steigt. Umgekehrt sinkt die Sensitivität mit steigender Temperatur, abnehmender Zyklenzahl und sinkender Magnesiumionenkonzentration. Dies bestätigte sich auch in den durchgeführten Versuchen, in denen DNA aus den in Kapitel 2.2. beschriebenen Verdünnungsreihen als Templet eingesetzt wurden. Unter den in Kapitel 2.6.1.1. genannten Versuchsbedingungen mit der Verdünnungsreihe von *SW-480* Zellen im Blut und dem Primer SET 2 GT zeigte sich, dass bei 30 Zyklen, einer Annealingtemperatur von 65°C mit einer Magnesiumionenkonzentration von 1,5 mM die niedrigste Nachweisgrenze erzielt wurde (Abbildung 6). Sie lag bei 10^3 Tumorzellen pro Milliliter Blut mit einer kerntragenden Zellkonzentration von 4,1 Terra/l. Bei einer Magnesiumionenkonzentration von 1,25 mM unter sonst unveränderten Versuchsbedingungen lag die Nachweisgrenze bei 10^4 Tumorzellen pro Milliliter Blut (Abbildung 5), bei einer Magnesiumionenkonzentration von 1,75 mM traten falsch positive Banden bei der Blutprobe auf (Abbildung 7). Eine weitere Steigerung der Temperatur über 65°C führte zu einer Erhöhung der Nachweisgrenze und zu einer Schwächung der β -

Globinkontrollbande. Bei niedrigeren Temperaturen traten trotz sinkender Magnesiumionenkonzentration falsch positive Ergebnisse auf (ohne Abbildungen).

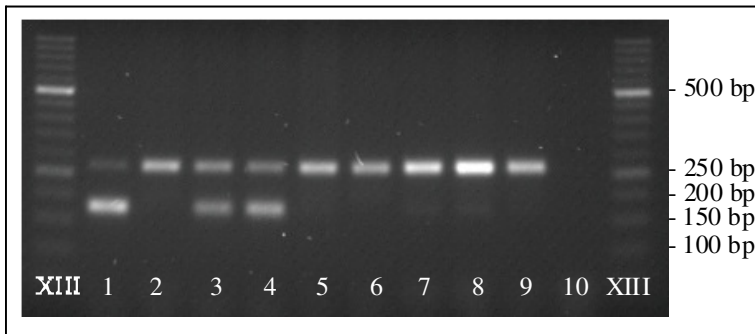


Abbildung 5: Gelelektrophorese der Produkte der MASA einer Verdünnungsreihe von *SW-480* Zellen in Blut und dem Sense-Primer SET 2 GT mit 30 Zyklen, 65°C Annealingtemperatur, 1,25 mM MgCl₂. Oben β -Globinkontrollbande (268 bp), darunter die Bande für den Nachweis der *K-ras*-Mutation GGT zu GTT (178 bp). Nachweis der *K-ras*-Mutation bis zu einer Verdünnung von 10⁴ Zellen auf einen Milliliter Blut. (1: *SW-480*, 2: Blut, 3: 10⁵ *SW-480* Zellen : 1 ml Blut, 4: 10⁴ : 1 ml, 5: 10³ : 1 ml, 6: 10² : 1 ml, 7: 10¹ : 1 ml, 8: 10⁰ : 1 ml, 9: 10⁻¹ : 1 ml, 10: Negativkontrolle, XIII: Molekularer Längenstandard XIII)

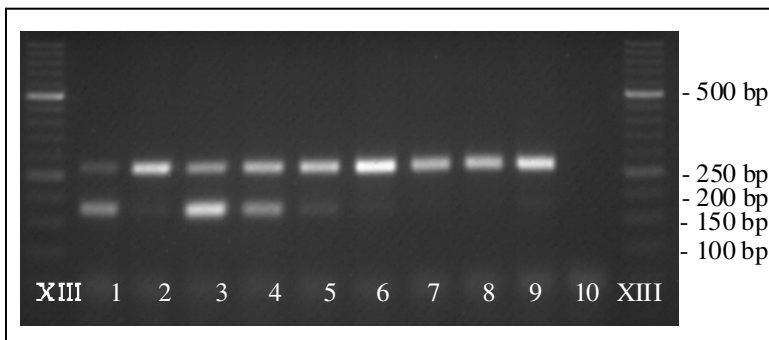


Abbildung 6: Gelelektrophorese der Produkte der MASA mit den Reaktionsbedingungen der MASA aus Abbildung 5 mit 1,5 mM MgCl₂. Nachweis der *K-ras*-Mutation bis zu einer Verdünnung von 10³ Zellen auf einen Milliliter Blut. (Legende siehe Abbildung 5)

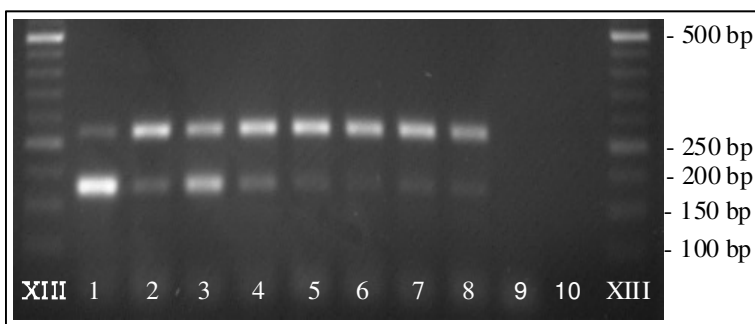


Abbildung 7: Gelelektrophorese der Produkte der MASA mit den Reaktionsbedingungen der MASA aus Abbildung 5 mit 1,75 mM MgCl₂. Unspezifisches Signal bei der Blutprobe. (Legende siehe Abbildung 5)

Trotz sorgfältigstem Arbeiten und Befolgen der Sicherheitshinweise schwankte die Nachweisgrenze bei der Versuchswiederholung gelegentlich um eine Zehnerpotenz. In solchen Fällen wurde nur das mehrfach zu reproduzierende Ergebnis gewertet.

3.1.2. Einfluss der dNTP-Konzentration auf die MASA

Die MASA zeigte bei einer Veränderung der dNTP-Konzentration von 100 μM auf 200 μM keinen Unterschied hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität. Bei einer dNTP-Konzentration von 50 μM war es jedoch nötig, die Zyklenzahl auf 31 zu steigern, um ein mit 200 μM dNTP in der Nachweisgrenze vergleichbares Ergebnis zu produzieren. Eine weitere Steigerung der Zyklenzahl führte zu einem falsch positiven Ergebnis. Die β -Globin spezifische Bande war bei einer dNTP-Konzentration von 50 μM deutlich schwächer als bei 200 μM (ohne Abbildung).

3.1.3. Einfluss der eingesetzten DNA-Menge auf die MASA

Bei einer DNA-Konzentration im Reaktionsansatz von 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ lag die kleinste nachzuweisende Zellzahl bei 10^4 Tumorzellen pro Milliliter Blut. Bei einer Steigerung der DNA-Konzentration auf 40 $\text{ng}/\mu\text{l}$ war selbst bei einer Zyklenzahl von 29 die Blutprobe falsch positiv (ohne Abbildung). Mit einer DNA-Konzentration von 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ ließen sich 10^3 Zellen in einem Milliliter Blut nachweisen (Abbildung 6, Kapitel 3.1.1.).

3.1.4. Einfluss der β -Globin-Primer auf die MASA

Schon bei den in Abschnitt 3.1.1. gezeigten Ergebnissen war zu erkennen, dass sich die β -Globinkontrollbande deutlich abschwächte, je deutlicher die *K-ras* spezifische Bande war (Vergleiche die β -Globinkontrollbande Spur 1 und 2 in Abbildung 6). In der MASA ohne β -Globin-Primer lag der Nachweis der *K-ras*-Mutation unverändert bei 10^3 Tumorzellen pro Milliliter Blut (Abbildung 8).

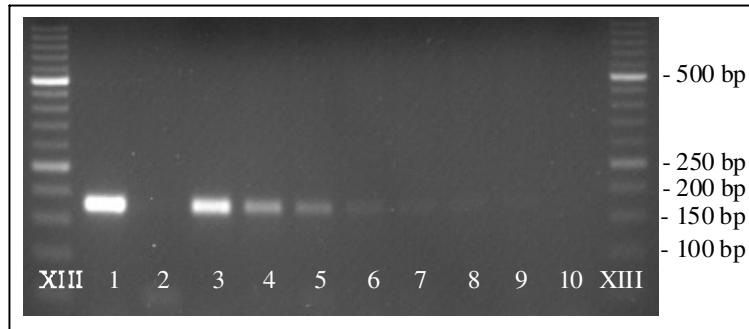


Abbildung 8: Gelelektrophorese der Produkte der MASA einer Verdünnungsreihe von SW-480 Zellen in Blut ohne β -Globinkontrollprimer. Nachweis der *K-ras*-Mutation bis zu einer Verdünnung von 10^3 Zellen auf eine Milliliter Blut (Vergleich mit Abbildung 6, Kapitel 3.1.). 30 Zyklen, 65°C Annealingtemperatur, 1,5 mM MgCl_2 (1: SW-480, 2: Blut, 3: 10^5 SW-480 Zellen : 1 ml Blut, 4: 10^4 : 1 ml, 5: 10^3 : 1 ml, 6: 10^2 : 1 ml, 7: 10^1 : 1ml, 8: 8 : 1 ml, 9: 10^{-1} : 1 ml, 10: Negativkontrolle, XIII: Molekularer Längenstandard XIII).

3.1.5. Variation der Polymerasen

Durch den Einsatz der Ampli-*Taq*-Stoffelfragment-Polymerase (Perkin and Elmer) ließ sich die untere Nachweisgrenze im Vergleich zur *Taq*-Polymerase (GibcoBRL) nicht weiter absenken. Wie bei der *Taq*-Polymerase traten bei 31 Zyklen unspezifische Banden auf (ohne Abbildung). Bei Verwendung der Qia-*Taq*-Polymerase (Qiagen) mit dem dazugehörigen ammoniumionenhaltigen PCR-Puffer ließ sich die Zyklenzahl auf 31 erhöhen, ohne dass eine unspezifische Bande auftrat. Die untere Nachweisgrenze ließ sich auf 10^2 Tumorzellen pro Milliliter Blut absenken. Die bei einer Konzentration von 10^1 und 10^0 Tumorzellen pro Milliliter Blut schwach erkennbaren Banden konnten nicht sicher reproduziert werden und wurden nicht als positiver Nachweis gewertet (Abbildung 9, Spur 7 und 8). Zusätzlich zeigte sich, dass das Ergebnis im Vergleich zur PCR mit *Taq*-Polymerase zuverlässiger zu reproduzieren war.

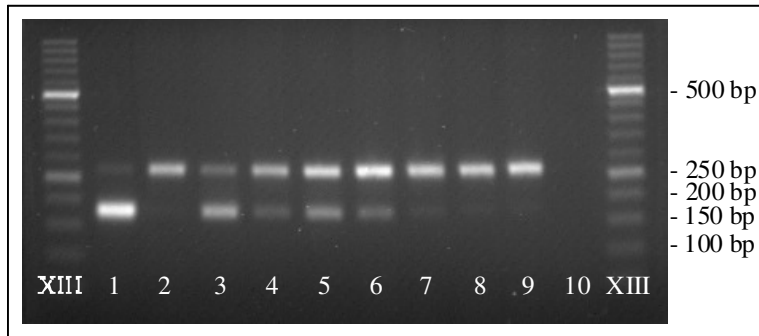


Abbildung 9: Gelelektrophorese der Produkte der MASA einer Verdünnungsreihe von SW-480 Zellen in Blut mit der Qia-Taq als DNA-Polymerase, 31 Zyklen und 65°C Annealingtemperatur. Nachweis einer K-ras-Mutation bis zu einer Verdünnung von 10^2 Zellen in einem Milliliter Blut. (1: SW-480, 2: Blut, 3: 10^5 SW-480 Zellen : 1 ml Blut, 4: 10^4 : 1 ml, 5: 10^3 : 1 ml, 6: 10^2 : 1 ml, 7: 10^1 : 1 ml, 8: 10 : 1 ml, 9: 10^{-1} : 1 ml, 10: Negativkontrolle, XIII: Molekularer Längenstandard XIII)

3.1.6. Die Nested MASA

Die Nested-PCR erbrachte unter den in Kapitel 2.6.1.6. beschriebenen Bedingungen die niedrigste Nachweisgrenze von nur 10^3 Zellen auf einen Milliliter Blut bei 22 Zyklen in der zweiten PCR. Die β -Globinkontrollbande war nur unregelmäßig und schwach zu sehen (ohne Abbildung).

3.1.7. Die Multiplex MASA

Der gleichzeitige Einsatz von drei Primern des SET 2 (Kapitel 2.7.2.) ergab auch bei nur 28 Zyklen deutliche falsch positive Banden, so dass hier keine ausreichende Empfindlichkeit zu erreichen war (ohne Abbildung).

3.1.8. Optimierung der übrigen MASA-Primer

Bisher wurden die MASA mit dem Primer SET 2 GT und der Verdünnungsreihe SW-480 in Blut durchgeführt. Im Folgenden wurden alle MASA-Primer (Tabelle 9) mit den beiden vorhandenen Verdünnungsreihen SW-480 und A-549 in einzelnen Reaktionen kombiniert.

Mit dem Einsatz des Primers SET 1 TA in der MASA (Kapitel 2.6.3.) zum Nachweis der K-ras-Mutation GGT zu AGT, in einer Verdünnungsreihe der

Tumorzelllinie *A-549* in Blut, lag die untere Nachweisgrenze unter der Verwendung der *Qia-Taq* ebenfalls bei 10^2 Zellen in einem Milliliter Blut. Bei der Erhöhung der Zyklenzahl auf 32 traten falsch positive Banden auf (ohne Abbildung).

Bei den Primern SET 1 TC, SET 1 TT, SET 2 GA und SET 3 TC traten in der MASA weder mit der Verdünnungsreihe von *SW-480* Zellen, noch von *A-549* Zellen bei 31 Zyklen falsch positive Ergebnisse auf (exemplarisch Abbildung 10 mit dem Primer SET 1 TC und der Verdünnungsreihe von *SW-480*). Mit dem für die Mutation der *SW-480* Zellen spezifischen Primer SET 2 GT und der Verdünnungsreihe von *A-549* und mit dem für die Mutation der *A-549* Zellen spezifischen Primer SET 1 TA und der Verdünnungsreihe von *SW-480* trat ebenfalls kein falsch positives Ergebnis auf (ohne Abbildung).

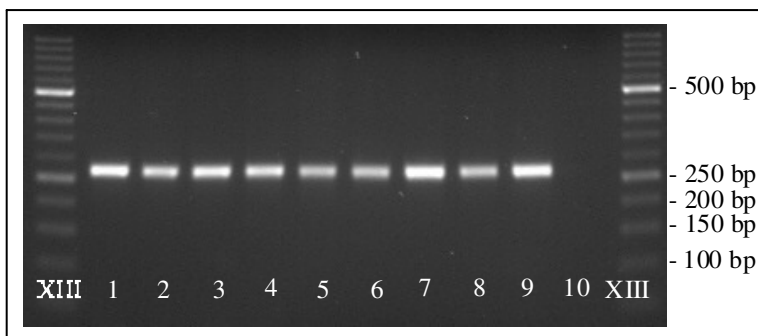


Abbildung 10: Gelelektrophorese der MASA Produkte mit einer Verdünnungsreihe von *SW-480* Zellen in Blut, analysiert mit dem nicht komplementären Primer SET 1 TC. Keine unspezifische Bande bei 178 Basenpaaren. (1: *SW-480*, 2: Blut, 3: 10^5 *SW-480* Zellen : 1 ml Blut, 4: 10^4 : 1 ml, 5: 10^3 : 1 ml, 6: 10^2 : 1 ml, 7: 10^1 : 1 ml, 8: 10 : 1 ml, 9: 10^{-1} : 1 ml, 10: Negativkontrolle, XIII: Molekularer Längenstandard XIII)

Die MASA mit dem Primer SET 2 GC und der Verdünnungsreihe von *SW-480* Zellen ergab wiederholt eine schwach positive Bande bei der unverdünnten *SW-480* DNA, die jedoch bei Reduzierung der Zyklenzahl auf 29 nicht mehr auftrat (ohne Abbildung). Schon bei einer Verdünnung von 10^5 *SW-480* Zellen in einem Milliliter Blut war das Ergebnis der MASA bei 31 Zyklen negativ (Abbildung 11).

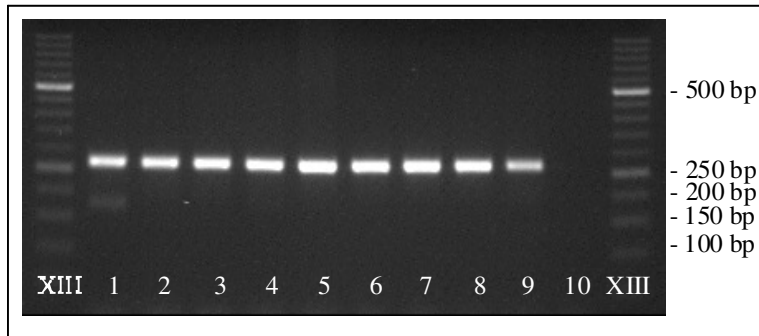


Abbildung 11: Gelelektrophorese der Produkte der MASA einer Verdünnungsreihe von SW-480 in Blut, analysiert mit dem Primer SET 2 GC und 31 Zyklen. Schwache, unspezifische Bande bei der unverdünnten SW-480 DNA. (1: SW-480, 2: Blut, 3: 10^5 SW-480 Zellen : 1ml Blut, 4: 10^4 : 1 ml, 5: 10^3 : 1 ml, 6: 10^2 : 1 ml, 7: 10^1 : 1 ml, 8: 10 : 1 ml, 9: 10^{-1} : 1 ml, 10: Negativkontrolle, XIII: Molekularer Längenstandard XIII)

Die MASA mit den Primern SET 3 TA und SET 3 GA lieferte, sowohl bei Steigerung der Annealingtemperatur auf 67°C , als auch bei Reduzierung der Zyklenzahl auf 29, falsch positive Ergebnisse für die Verdünnungsreihen von SW-480 und A-549 Zellen in Blut. Sie wurden deshalb nicht für die Analyse der *K-ras*-Mutationen eingesetzt (ohne Abbildung).

3.1.9. Optimierte Reaktionsbedingungen für die Analyse der Tumor-DNA auf K-ras-Mutationen

Da der Anteil der Tumor-DNA in den DNA-Proben, die aus Frischtumoren und paraffineingebetteten Tumoren isoliert wurden, weit über 1 zu 100 lag, wurde zur Vereinfachung der MASA-Bedingungen die Zyklenzahl für die Analyse von *K-ras*-Mutationen von 30 auf 29 Zyklen gesenkt. So konnte bei geringerer Empfindlichkeit das Risiko für falsch positive Ergebnisse reduziert werden. Die Annealingtemperatur lag bei 65°C (Reaktionsansatz mit Tumor-DNA wie in Tabelle 17).

Tabelle 20: Reaktionsansatz der MASA zur Analyse der Tumorproben.

Mastermix		Endkonzentration
Qiagen 10X PCR Puffer incl. 15 mM MgCl ₂		Mg ²⁺ : 1,5 mM
Sense-Primer laut Tabelle 8		1 pmol/μl
Antisense-Primer	K1204 L	1 pmol/μl
Kontrollprimer	β-Globin 5'	0,1 pmol/μl
	β-Globin 3'	0,1 pmol/μl
Nukleotide	dNTP	200 μM
Polymerase	Qia-Taq	1,25 U/50 μl
H ₂ O		
Tumor-DNA		10 ng/μl
Gesamtvolumen		50 μl

Die Proben inkubierten nach Überlagerung mit 20 μl Mineralöl im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	3min	80°C (Hot start)
29 Zyklen	0.5min	95°C (Denaturierung)
	1,5min	65°C (Primerannealing)
	1min	72°C (Primerelongation)
abschließend	7min	72°C (Finale Elongation)
	Kühlung auf	+ 4°C (Reaktionsende)

3.1.10. Optimierte Reaktionsbedingungen für die Analyse der Blut-DNA auf K-ras-Mutationen

Die MASA der reinen SW-480-DNA lieferte, mit dem zu dieser Mutation nicht komplementären Primer SET 2 GC, ein falsch positives Ergebnis. Da jedoch schon bei einer Verdünnung von 10⁵ SW-480 Zellen auf einen Milliliter Blut das Ergebnis negativ war, wurde die MASA für alle Primer mit 31 Zyklen durchgeführt. Die übrigen PCR-Bedingungen waren mit denen zur Analyse der Tumor-DNA (Kapitel 3.1.9., Tabelle 20) identisch.

3.2. Nachweis von K-ras-Mutationen in DNA von Frisch- und in Paraffin eingebetteten Tumoren mit der MASA

K-ras-Mutationen wurden in insgesamt 19 der 74 untersuchten Tumor-DNA-Proben gefunden (26%), davon sechs in Frischtumor-DNA-Proben, neun in Paraffintumor-DNA-Proben und bei vier der 14 doppelt vorhandenen DNA-Proben. Die 19 Mutationen fanden sich alle in Kodon 12, zwei von GGT nach TGT (10%), 6 von GGT nach GTT (32%) und 11 von GGT nach GAT (58%).

3.3. Nachweis von K-ras-Mutationen in DNA von Frischtumoren mit der Sequenzierung

Die *K-ras*-Mutationsanalyse der DNA-Verdünnungsreihe von *SW-480*-DNA und Wildtyp-DNA mit der Sequenzierung war bis zu einem Verhältnis von 1 zu 5 möglich. Dennoch traten unspezifische Banden auf, die bei unbekannter Sequenz nicht sicher von einer Mutation unterschieden werden konnten (siehe Abbildung 12). So konnte diese Methode über das Vorliegen von *K-ras*-Mutationen nur einen Hinweis, nicht aber eine definitive Aussage geben.

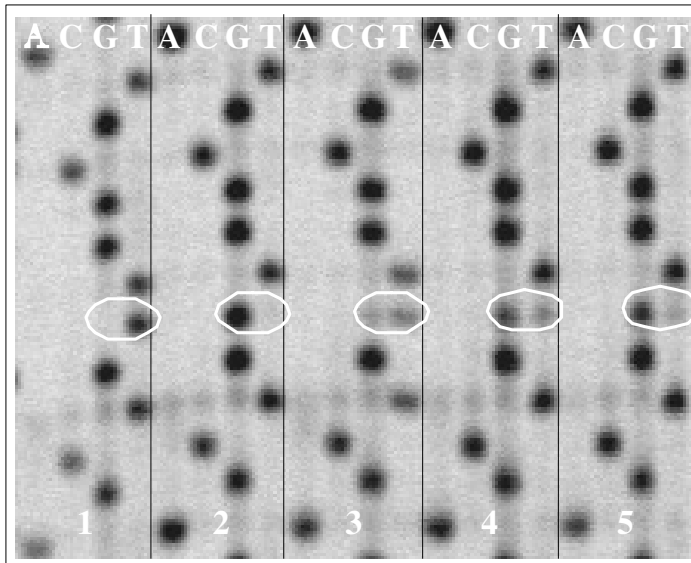


Abbildung 12: Sequenzierung einer Verdünnung von DNA aus SW-480 Zellen und Wildtyp-DNA. Die DNA-Sequenz wird von unten nach oben gelesen. Markiert ist die 2. Stelle des Kodon 12. Deutlich erkennt man die homozygote Mutation der SW-480-DNA von G zu T in Spalte 1 im Vergleich zur Wildtyp-DNA in Spalte 2. In Spalte 3 und 4 erkennt man die Wildtyp- und die mutierte DNA, in Spalte 5 ist die Mutation der SW-480 DNA bei einer Verdünnung von eins zu zehn nicht zu sehen. Zwei Zeilen tiefer eine Reihe von unspezifischen Banden neben der tatsächlichen Bande in der T-Spur. (1: SW-480, 2: Wildtyp, 3: SW-480 : Wildtyp 1 : 1, 4: SW-480 : Wildtyp 1:5, 5: SW-480 : Wildtyp 1:10)

Bei der exemplarischen Analyse von 15 zufällig ausgesuchten Frischtumorproben konnte bei zwei Tumoren eine Mutation in Kodon 12 von GGT zu GTT (Abbildung 13) und eine von GGT zu GAT nachgewiesen werden. Bei den übrigen 12 Proben ergab sich auch in der digitalen Darstellung kein Hinweis auf eine Mutation im Kodon 12 oder 13 (Abbildung 14). Bei der Analyse von DNA aus Paraffintumoren konnte kein verwertbares Ergebnis erbracht werden.

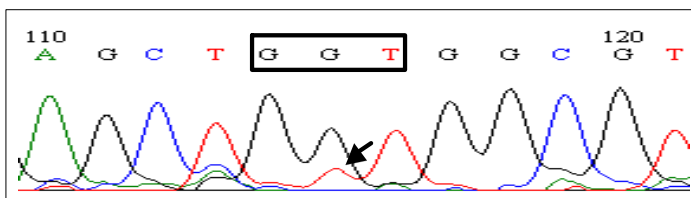


Abbildung 13: Chromatogramm der Sequenzierung der DNA von Tumor C23. Mit dem Pfeil markierte Mutation von G zu T. Im Kasten markiert das Kodon 12.

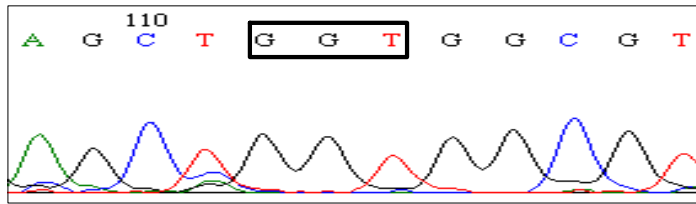


Abbildung 14: Chromatogramm der Sequenzierung der DNA von Tumor C38. Im Kasten markiert das Kodon 12. Kein Hinweis auf das Vorliegen einer Mutation in Kodon 12 oder 13.

3.4. Nachweis von K-ras-Mutationen in DNA von Frischtumoren durch die TTGE

Durch die TTGE-Analyse der 30 Frischtumorproben wurden bei sieben Tumoren *K-ras*-Mutationen nachgewiesen. Da der Unterschied der mutierten Homoduplex und der Vergleichstumorzelllinien *SW-480* und *A-549* bezüglich der Laufstrecke sehr gering war, war eine direkte Zuordnung zu den möglichen Mutationen nicht sicher möglich. Es schien jedoch wahrscheinlich, dass die Proben C40, C64, C82 und C92 sowie die Proben C51 und C65 je einer Mutation zu zuordnen waren. Das Bandenmuster der Mutation der Probe C29 konnte nur bei dieser Probe nachgewiesen werden (Abbildung 15 und 16). Die Analyse von DNA aus in Paraffin eingebetteten Tumoren erbrachte keine verwertbaren Ergebnisse.

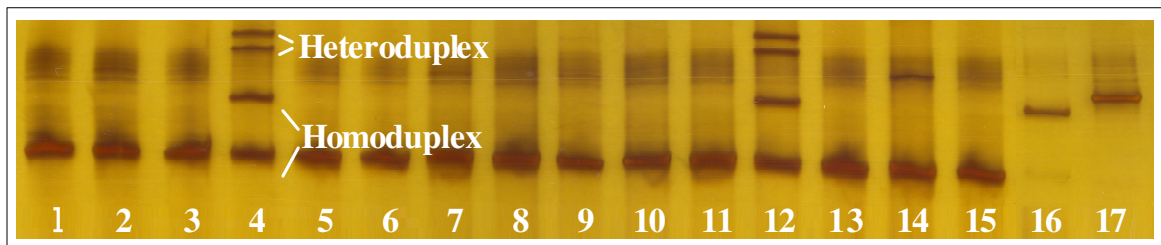


Abbildung 15: TTGE-Analyse auf *K-ras*-Mutationen von 15 Tumorproben und 2 Zelllinien. Die Proben 4 und 12 sowie die zwei Zelllinien weisen eine *K-ras*-Mutation auf, die der Zelllinien ist homozygot. (1: C67, 2: C76, 3: C81, 4: C82, 5: C83, 6: C85, 7: C86, 8: C87, 9: C97, 10: C91, 11: C92, 12: C93, 13: C94, 14: C95, 15: C96, 16: *SW-480*, 17: *A-549*)

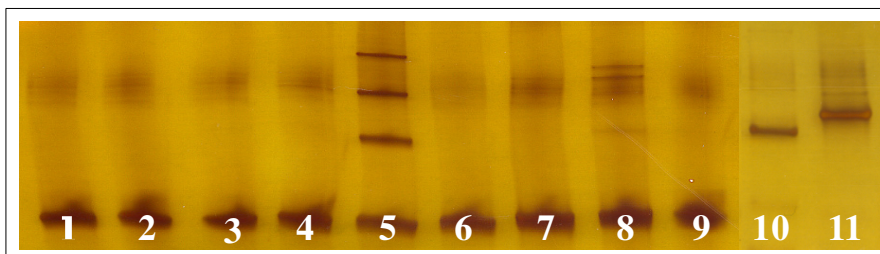


Abbildung 16: TTGE-Analyse auf *K-ras*-Mutationen von neun Tumorproben und zwei Zelllinien. Die Proben 5 und 8 sowie die zwei Zelllinien weisen eine *K-ras*-Mutation auf. Die mutierte Homoduplex der Probe 5 liegt deutlich tiefer als die der Proben 8, 10 und 11. (1: C12, 2: C16, 3: C17, 4: C18, 5: C29, 6: C32, 7: C35, 8: C40, 9: C48, 10: *SW-480*, 11: *A-549*)

3.5. Zusammenfassung des Nachweises der K-ras-Mutationen in Tumor-DNA durch MASA, Sequenzierung und TTGE

Das Ergebnis der MASA der 14 Tumor-DNA-Proben, die sowohl aus Paraffingewebe, als auch aus Frischtumor untersucht wurden, war identisch. In vier Paraffintumorproben wurde eine *K-ras*-Mutation identisch zu der in den Frischtumorproben nachgewiesen. Bei den übrigen zehn Proben konnte weder in der Paraffintumor-DNA, noch Frischtumor-DNA eine Mutation nachgewiesen werden.

Bei der Analyse der 15 Frischtumorproben durch Sequenzierung wurden zwei *K-ras*-Mutationen identisch zu denen der MASA nachgewiesen. In drei Proben konnten die in der MASA nachgewiesenen *K-ras*-Mutationen nicht durch Sequenzierung nachgewiesen werden. Eine Probe wies eine Mutation im Kodon 12 von GGT zu GTT in der Sequenzierung auf, die weder in der MASA des Paraffintumors, des Frischtumors noch in der TTGE-Analyse nachgewiesen werden konnte.

In der TTGE-Analyse der 30 Frischtumorproben wurden sieben Mutationen nachgewiesen. Eine dieser Mutationen konnte in der MASA nicht nachgewiesen werden. Das Verteilungsmuster der Homoduplex wich deutlich von den Mutationen des Kodon 12 der Tumorzelllinien *SW-480* und *A-549*, GTT und GAT ab (Abbildung 16, Spur 5).

Keine der in der TTGE-Analyse negativen Proben wies eine *K-ras*-Mutation in der MASA auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 im Kapitel 8 einzeln aufgelistet.

3.6. MASA Analyse der Blutproben der Tumor- und der Kontrollgruppe

Es wurden 19 Blutproben von Patienten, deren Tumoren eine *K-ras*-Mutation aufwiesen, mit der MASA auf *K-ras*-Mutation zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen untersucht. In zwei Blut-DNA-Proben wurde eine Mutation entsprechend der Mutation im Tumor nachgewiesen. Es handelte sich um eine Mutation an der zweiten Stelle im Kodon 12 von GGT zu GTT der Probe C38 (Abbildung 17) und von GGT zu GAT der Probe C26 (Abbildung 18). Dies entspricht dem Nachweis von mindestens 10^2 disseminierten Tumorzellen auf einen Milliliter Blut (Kapitel 3.1.8). Dieses Ergebnis wurde je drei Mal reproduziert.

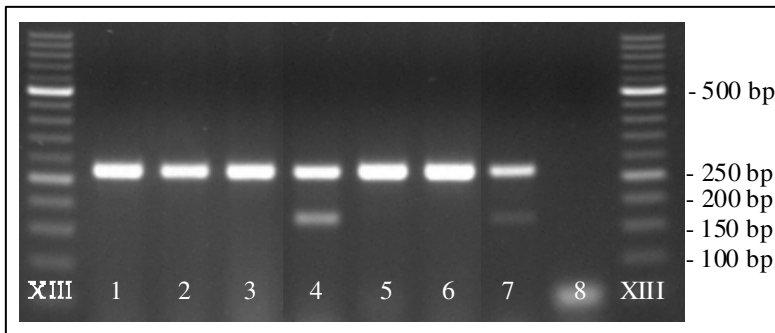


Abbildung 17: Gelelektrophorese der Produkte der MASA der Blutproben, deren zugehörige Tumoren eine Mutation von GGT nach GTT aufwiesen, mit dem MASA-Primer SET 2 GT. In der Spur 4 und 7 erkennt man eine eindeutige Bande bei 178 bp. (1 bis 6: DNA-Proben aus Patientenblut, 1: C10, 2: C23, 3: C33, 4: C38, 5 : C51, 6: C65, 7: Positivkontrolle mit 10^2 SW-480 Zellen in 1 ml Blut., 8: Negativkontrolle, XIII: Längenstandard)

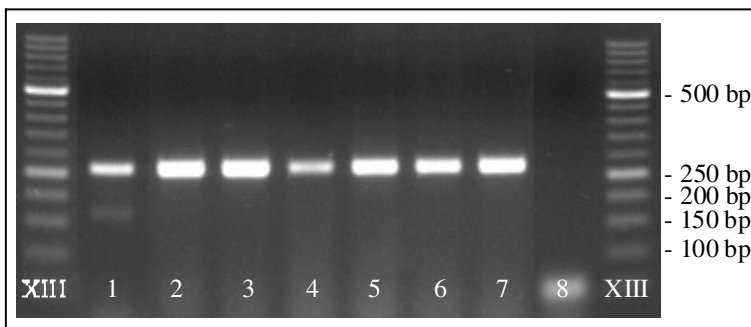


Abbildung 18: Gelelektrophorese der Produkte der MASA der Blutproben, deren zugehörige Tumoren eine Mutation von GGT nach GAT aufwiesen, mit dem Sense-Primer SET 2 GA. In der Spur 1 erkennt man eine Bande bei 178 bp. (1 bis 7: DNA-Proben aus Patientenblut, 1: C26, 2: C40, 3: C49, 4: C62, 5 : C64, 6: C69, 7: C82, 8: Negativkontrolle, XIII: Längenstandard)

Bei zehn zufällig ausgesuchten Blut-DNA-Proben von Patienten, deren Tumor-DNA keine *K-ras*-Mutation aufwies, konnte mit der MASA keine der sieben untersuchten *K-ras*-Mutationen nachgewiesen werden auf. Ebenso konnte bei den 27 Blutproben der Kontrollgruppe keine *K-ras*-Mutation nachgewiesen werden. Selten traten sehr schwache, unspezifische Banden im Bereich von 176-179 bp auf, die jedoch in der Wiederholung der Reaktionen nicht zu reproduzieren waren (ohne Abbildung).

3.7. Analyse der Überlebenszeit der nachuntersuchten Patienten

Von den 74 Patienten mit kolorektalem Karzinom, die in die klinische Studie mit einbezogen wurden, konnten 73 im Verlauf weiter verfolgt werden. Vier der Patienten, die

bis März 2004 nachbeobachtet wurden, verstarben in den ersten 30 Tagen nach der Operation. Da es sich hierbei wahrscheinlich um Todesfälle in Zusammenhang mit postoperativen Komplikationen handelt und nicht um Tumorfolgen, wurden sie nicht in die Überlebensauswertung einbezogen. Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit der verbleibenden 69 Patienten betrug 63 Monate (77 – 45 Monate). In diesem Zeitraum verstarben 23 Patienten. Die beiden Patienten mit positivem Tumorzellnachweis im Blut waren nach 75 und 73 Monaten tumorfrei und nicht verstorben. Ein Patient mit dysplastischem Polyp wurde getrennt beobachtet und war nach 74 Monaten tumorfrei.

Tabelle 21: Häufigkeitsverteilung der Tumorstadien und deren Bezug zum Überleben der Patienten im Beobachtungszeitraum.

Tumorstadium	Anzahl	Anteil an der Gesamtanzahl	Verstorben
I	19	28%	2
II	25	36%	9
III	14	20%	3
VI	11	16%	9
Gesamtzahl	69	100%	23

4. Diskussion

Das Lebenszeitrisko, in Deutschland an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt 6% (Robert Koch-Institut, 2002). Bis in die Mitte der 90er Jahre blieb die Fünfjahresüberlebensrate nahezu konstant bei 50%. Erst in den letzten Jahren gelang es, diese leicht zu bessern. Wichtigster Faktor hierfür ist die bessere Früherkennung (Schön et al., 1999; Robert Koch-Institut, 2002). Auch in der Tumornachsorge wurden, insbesondere die Lebensqualität betreffend, aber auch bezüglich der Überlebenszeit Fortschritte gemacht (Mayo Clinic, 1999). Zuverlässigster prognostischer Marker ist immer noch die Einteilung in Tumorstadien (Fisher et al., 1989; Wood, 1971). Der Verlauf in der Gruppe eines Tumorstadiums ist jedoch sehr heterogen (Schnipper, 1986; Ahnen, 1991; Heppner und Miller, 1989), d.h. die postoperative Prognose eines Patienten mit einem kolorektalen Karzinom im Stadium II kann sowohl zwei als auch 20 Jahre sein. Um die Patienten mit schlechter Prognose einer adjuvanten Therapie zuführen zu können und Patienten mit guter Prognose eben diese zu ersparen, gibt es Bestrebungen, weitere prognostische Marker zu finden (Johnson et al., 1995). Der Differenzierungsgrad eines Tumors hat bereits Einzug in die Therapieempfehlungen gehalten (Mayo Clinic, 1999). Zurzeit untersuchte Marker sind die Mikrosatelliteninstabilität, sowie Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *p53*, *DCC* („deleted in colorectal cancer gene“), und im Protoonkogen *K-ras* (Seufferlein et al. 2003, Andreyev et al., 1998). Bei der Nachuntersuchung von 2721 Patienten mit Kolonkarzinomen ergab sich ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Tumorrezidiv ($p= 0.001$) und Tod ($p= 0.004$) für Patienten, deren Tumor-DNA eine *K-ras*-Mutationen aufwies. Dies galt besonders für die Mutation in Kodon 12 von Guanin zu Thymin (Andreyev et al., 1998). Untersuchte man ausschließlich Tumoren im Stadium II, so war die Prognose bei Tumoren mit Mutationen von Glycin (GGT) zu Aspartat (GAT) signifikant schlechter ($p= 0.0001$) (Hayashi et al., 1999). In einer Phase-II-Studie konnten Gnanasampanthan et al. (2001) zeigen, dass Patienten mit einer Mutation im Kodon 12 und 13 des *K-ras*-Gens, die nicht zu einem Austausch der Aminosäure zu Aspartat führte, besser auf eine 5-FU-Chemotherapie ansprachen.

Dass Tumorzellen in die Blutbahn freigesetzt werden, ist schon seit langem bekannt (Pool et al., 1934; Fisher und Thurnbull, 1955; Engell, 1955; Sandberg et al., 1957; Salisbury et al., 1965). Da dies auch schon in frühen Tumorstadien ohne Metastasierung geschieht, scheint der Begriff *disseminierte Tumorzellen* genauer zu sein, als der häufig benutzte Begriff der Mikrometastasen (Glaves et al., 1988; Glaves, 1983;

Mayhew et al., 1984; Weiss, 1990; Fidler, 1991; O'Sullivan et al., 1997). Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit kolorektalem Karzinom, Brust-, Lungen-, Prostata- oder Magenkrebs wird in den meisten Studien als negativ prognostischer Faktor gesehen (Lindemann et al., 1992; Schlimok et al., 1990 und 1991; Andreyev und Cunningham, 1997). Über die prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen im venösen Blut liegen nur wenige Arbeiten vor, die zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen (Engell, 1959; Roberts et al., 1961; White und Griffiths, 1976; Johnson et al., 1995; Broll et al., 1999). Ursächlich können hier die unterschiedlichen Nachweisverfahren sein (Leather et al., 1993).

In den meisten Untersuchungen wurden die disseminierten Tumorzellen zytomorphologisch oder immunhistochemisch im Blut nachgewiesen (Brugger et al., 1994; Fisher und Turnbull, 1955; Leather et al., 1993). Nun sind aber beispielsweise die Zellen solider Tumoren in der Immunhistochemie für die häufig genommenen Marker CK 8, CK 18 und CK 20 nur zu 18 - 36% positiv und die von Lebermetastasen zu 10 - 59% (Litle et al., 1997). Hieraus ist zu schließen, dass man mit der Immunhistochemie eine begrenzte Anzahl von Tumorzellen im Blut nachweist. Ob dies möglicherweise für die prognostische Bedeutung entscheidend ist oder nicht, ist noch nicht geklärt. Die Rate von falsch positiven Ergebnissen, insbesondere bei der konventionellen Zytologie, aber auch bei der Immunhistochemie, ist untersucherabhängig unterschiedlich hoch (Cooper et al., 1985; Krisman et al., 1995; Hashimoto et al., 2000). Pantel et al. (1993) wiesen bis zu 10 CK8 und CK 18 positive Zellen auf 10^5 Wildtypzellen im Knochenmark von gesunden Patienten nach. Ein weiterer Nachteil liegt in der unteren Nachweisgrenze von einer Tumorzelle auf 100 Wildtypzellen für die zytologische und einer auf 10^5 Wildtypzellen für den immunhistochemischen Nachweis nach Tumorzellanreicherung (Johnson et al., 1995). Für die Prognose scheint die Anzahl der nachgewiesenen Tumorzellen entscheidend zu sein. So sprechen einige Autoren in Zusammenhang mit dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Magen- oder Mammakarzinom von einer relevanten Tumorzellzahl. Beim Magenkarzinom wird sie mit 3 auf 10^6 und beim Mammakarzinom mit 10 auf 10^6 Wildtypzellen angegeben (Jauch et al., 1996).

Um diese Unsicherheiten der Zytologie und Immunhistochemie zu umgehen, wurden in den letzten Jahren zahlreiche molekulare Methoden mit unterschiedlichen Nachweisgrenzen entwickelt (Überblick in Tabelle 22).

Tabelle 22: Molekulare Nachweisverfahren für Tumorzellen und ihre Nachweisgrenzen.

Methode	Nachweisgrenze	Autor
Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis	eine Tumorzelle auf 10 Wildtypzellen	Losi et al. (1996)
Cytokeratin 20 Reverse Transkriptase PCR	10^2 Tumorzellen auf 10^6 Wildtypzellen	Nakamori et al. (1997)
Competitive Allele Specific Oligonucleotide Hybridisation (cASO)	eine Tumorzelle auf 100 Wildtypzellen	Carpenter et al. (1996)
Amplification Refractory Mutation System (ARMS)	eine Tumorzelle auf 1000 Wildtypzellen	Newton et al. (1989)
Mutant Enriched Polymerase Chain Reaction (ME-PCR)	eine Tumorzelle auf 5000 Wildtypzellen	Carpenter et al. (1996)
Enriched Polymerase Chain Reaction	eine Tumorzelle auf 10^3 - 10^4 Wildtypzellen	Kahn et al. (1991)
Ligase Chain Reaction (LCR)	eine Tumorzelle auf 10^2 - 10^3 Wildtypzellen	Lehman et al. (1996)
Mutant Allele Specific Amplification (MASA)	eine Tumorzelle auf 10^3 Wildtypzellen	Takeda et al. (1993)

Der Vorteil der MASA gegenüber den in Tabelle 22 aufgeführten Methoden ist die schnelle und unkomplizierte Durchführbarkeit der Reaktion ohne den Einsatz von radioaktiven Substanzen (Cotton, 1993). Das Prinzip der MASA (schematische Darstellung in Abbildung 3, Kapitel 1.8) wurde erstmalig von Wu et al. (1989) beschrieben und von Takeda et al. (1993) als „Mutant Allele Specific Amplification“ (MASA) weiterentwickelt. Die Tumorzellen werden indirekt über *K-ras*-Mutationen nachgewiesen. Auf diesem Prinzip beruhend wurden zahlreiche Methoden entwickelt, die sich vor allem durch die Vor- und Nachbehandlung der Proben unterscheiden (Kapitel 1.8.). Die untere Nachweisgrenze wurde mit unterschiedlichen Verfahren nachgewiesen und schwankte zwischen einer Tumorzelle auf 10^2 Wildtypzellen (Losi et al., 1996) und einer Tumorzelle auf 10^5 - 10^6 Wildtypzellen (Watanabe et al., 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu klären, ob mit der MASA eine Methode entwickelt wurde, die es in ausreichender Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit ermöglicht, über den Nachweis von *K-ras*-Mutationen im Blut von Patienten mit kolorektalen Karzinomen, disseminierte Tumorzellen nachzuweisen. Hierzu war es zunächst nötig, die Bedingungen der MASA zu optimieren und die zu erreichende untere Nachweisgrenze zu bestimmen. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden Verdünnungsreihen von Tumorzelllinien mit bekannter *K-ras*-Mutation im Probandenblut erstellt, da dies, im Vergleich zu anderen Verfahren, z.B. der Verdünnung von Tumor-DNA in Wildtyp-DNA, der eigentlichen Analyse am ähnlichsten ist (Johnson et al., 1995). Der Tumorzellnachweis wurde auf einen Milliliter Blut angegeben, da dies der praktischen Anwendung entspricht. Durch Variation der PCR-Bedingungen konnte die untere Nachweisgrenze auf 10^2 Tumorzellen pro Milliliter Vollblut bei einer Leukozytenkonzentration von 4,1 Terra/l gesenkt werden. Bezogen auf das Verhältnis zwischen Tumor- und Wildtypzellen entspricht dies dem Nachweis von einer Tumorzelle auf $4,1 \times 10^4$ Wildtypzellen. Damit lag die untere Nachweisgrenze im oberen Drittel der in der Literatur angegebenen Grenze (Takeda et al., 1993; Hayashi et al., 1994; Lecomte et al., 2002), jedoch noch deutlich unter der von Losi et al. (1992) beschriebenen Grenze von einer Tumorzelle auf 10^6 Wildtypzellen. Da im Reaktionsansatz der MASA nur ungefähr ein Zwanzigstel der DNA eingesetzt werden konnte, die aus einem Milliliter Blut isoliert wurde, war eine weitere Senkung der Nachweisgrenze auf eine Tumorzelle pro Milliliter nicht zu erwarten.

Die in der Literatur angegebenen Reaktionszeiten der MASA und Temperaturen waren, trotz Verwendung nahezu identischer Primer, ausgesprochen unterschiedlich. Takeda et al. (1993) führten die PCR mit 32 Zyklen bei einer Denaturierung von 95°C für 30 s, einer Annealingtemperatur von 59 bis 60°C für 2 min und einer Elongation bei 70°C für 2 min durch. Hayashi et al. (1994) steigerten die Zyklenzahl auf 35 und die Annealingtemperatur auf 64 bis 65°C für 1,5 min. Die Konzentrationen der MASA-Primer, der Kontrollprimer, Tris-HCl, KCl, dNTP, der Templet-DNA und der DNA-Polymerase in den Reaktionsansätzen waren zu denen in dieser Arbeit nahezu identisch. Losi et al. (1992) steigerten die Zyklenzahl auf 40 bis 45 und reduzierten die Annealingtemperatur auf 55°C für 2 min bei einer Magnesiumkonzentration von 2 mmol/l mit Zusatz von Gelatine. Bei Pajakos et al. (2000) lag die Annealingtemperatur je nach MASA-Primer zwischen 59 und 64°C .

In dieser Arbeit wurde das beste Ergebnis mit 31 Zyklen bei einer Denaturierung für 30 s bei 95°C, einer Annealingtemperatur von 65°C für 90 s und einer Elongation von 60 s bei 72°C erzielt. Kleinere Temperaturunterschiede und Unterschiede in den Reaktionszeiten sind durch den Einsatz unterschiedlicher PCR-Geräte zu erklären. Die Unterschiede in der Annealingtemperatur von bis zu 5°C sind durch den Einsatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) bei einigen Autoren bedingt. DMSO senkt die mittlere Hybridisierungstemperatur und ermöglicht so, die Annealingtemperatur zu reduzieren. Warum Losi et al. (1992) gegenüber den anderen Versuchsprotokollen zehn Zyklen mehr durchführten, ist aus den angegebenen Daten nicht nachvollziehbar.

In dieser Arbeit traten bei der Analyse der reinen SW-480-DNA mit dem Primer SET 2 GC bei 30 Zyklen falsch positive Ergebnisse auf, so dass für die Analyse der Tumor-DNA die Zyklenzahl auf 29 reduziert wurde. Bei gutem Ergebnis für die Verdünnung der Tumorzellen in Blut war eine Reduktion der Zyklenzahl bei der Analyse des Blutes nicht nötig. In den zur MASA zitierten Arbeiten wurde dieses Problem nicht erwähnt.

Ein sichtbares Ergebnis in der Agarosegelelektrophorese gibt es erst bei ungefähr 10^{11} Kopien der DNA (Rhodes et al., 1997). Dieser Wert ist abhängig von der Länge der DNA, der Gelzusammensetzung und der Untersuchungsapparatur und entspricht nur einem Richtwert. Das Erreichen einer solchen Anzahl ist bei der MASA entscheidend abhängig von der Bindungsenergie zwischen dem Basenmismatch am 3'-Ende des Primers und der Proben-DNA. Rhodes et al. (1997) quantifizierten die DNA-Kopien bei Basenmismatch in der MASA mit Hilfe von radioaktiver Markierung. So zeigten sie, dass ein Basenmismatch von C und A deutlich stabiler ist, d.h. es gibt eher ein falsch positives Signal, als ein Basenmismatch von A und G, T und G, T und C und G und C. Der Basenmismatch vom Primer SET 2 GC und dem Komplementärstrang der SW-480-DNA entspricht einem Basenmismatch C und A, so dass ein falsch positives Ergebnis bei der Analyse der SW-480-DNA hierdurch erklärt ist. Ebenso entsteht bei den Primern SET 3 TA und SET 3 GA zur Wildtyp-DNA ein Basenmismatch zwischen C zu A. Im Gegensatz zu Losi et al. (1992) konnte mit diesen beiden Primern trotz Variation der Annealingtemperatur und Zyklenzahl keine MASA ohne fehlerhaftes Ergebnis durchgeführt werden. Eine Kombination von allen möglichen Punktmutationen im *K-ras*-Gen und den 9 Primern der MASA wurde in keiner der Arbeiten durchgeführt. Der Einfluss der von Kidd et al. (1983) und Losi et al. (1992) beschriebenen erhöhten Bindungsenergie vom Basenmismatch G zu T, konnte weder von Rhodes et al. (1997) noch in dieser Arbeit bestätigt werden.

Rhodes et al. (1997), Losi et al. (1996) und Watanabe et al. (1999) konnten durch Reduktion der dNTP-Konzentration die Nachweisgrenze senken. Die Reduktion der dNTP-Konzentration von 200 μM über 100 μM auf 20 μM erbrachte in dieser Arbeit keine Verbesserung der Nachweisgrenze. Bei 20 μM dNTP musste die Zyklenzahl um einen Zyklus erhöht werden, um die gleiche Nachweisgrenze wie mit 200 μM zu erreichen.

Je größer die eingesetzte DNA-Menge in einer PCR-Reaktion ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich unter der DNA auch eine mutierte DNA befindet. Gleichzeitig interagiert eine hohe DNA-Konzentration mit den Primern und beeinflusst so das Ergebnis (Harris und Jones, 1997). Die optimale DNA-Konzentration lag bei 10 ng/ μl . DNA-Konzentrationen von 40 ng/ μl und mehr führten zu falsch positiven Ergebnissen. Die von Losi et al. (1992) eingesetzte DNA-Konzentration lag zwischen 1,3 und 13,3 ng/ μl , ohne dass hier angegeben wurde, ob Schwankungen das Ergebnis beeinflussten. Bei Hasegawa et al. (1995) lag die DNA-Konzentration bei 4 ng/ μl .

In der MASA dürfen ausschließlich DNA-Polymerasen ohne 3'-Exonukleaseaktivität eingesetzt werden. Der Einsatz von Ampli-*Taq* Stoffelfragment, einer DNA-Polymerase mit 5'-Exonukleaseaktivität zur Reduktion von Synthesefehlern (Chen and Zarbl, 1997), erbrachte in der vergleichenden PCR mit der *Taq*-Polymerase keine Senkung der Nachweisgrenze. Dies wurde in der Arbeit von Rhodes et al. (1997) bestätigt. Dem gegenüber erbrachte der Zusatz der Ammoniumionen im Qia 10X PCR-Puffer eine Verbesserung der Nachweisgrenze um eine Zehnerpotenz. Die vorgegebene Magnesiumionenkonzentration von 1,5 mM führte zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, im Vergleich zu manuell zugefügtem Magnesium. Dies ist leicht verständlich, da schon minimale Schwankungen in der Magnesiumionenkonzentration zu einem veränderten Ergebnis der MASA führen und Pipettierfehler bis zu 5%, auch bei automatischen Pipettierhilfen, nicht auszuschließen sind.

Mit der „Nested-PCR“ konnte die Nachweisgrenze nicht gesteigert werden. Dies ist durch das weiterhin unveränderte Verhältnis von Tumor-DNA zu Wildtyp-DNA und den, trotz Einsetzen der *Pfu*-Polymerase mit Proofreadingfunktion, zu erwartenden Einbau von Mutationen bei der DNA-Synthese in der ersten PCR zu erklären (Khanna et al., 1999). In einigen Arbeiten wurde eine Nested-PCR eingesetzt, da die isolierte DNA-Menge, z.B. aus Stuhl, zur Analyse in mehreren PCR-Reaktionen nicht ausreichte (Hasegawa et al., 1995). Ein Absenken der Nachweisgrenze wurde nicht erwähnt.

Mit den zur Verfügung stehenden Mitteln war eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenze nicht möglich. Durch den gleichzeitigen Einsatz von mehreren

Upstreamprimern erreichten Losi et al. (1992) eine Reduktion der durchzuführenden PCR-Reaktionen. In dieser Arbeit reduzierte sich durch den gleichzeitigen Einsatz von mehreren Primern die Nachweisgrenze deutlich. Dies ist durch Interaktionen von Primern, die sich nur durch eine Base unterscheiden, zu erklären (Khanna et al., 1999).

Die in der Literatur angegebene Anzahl disseminierter Tumorzellen im Blut liegt zwischen 60 und 200/ml (Leather et al., 1993). Im klinischen Teil der Arbeit wurde nun untersucht, ob die Suche nach Mutationen im *K-ras*-Gen mit der MASA erfolgreich ist und ob der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Blut möglich und von klinischer Relevanz ist.

Von den anfänglich 92 Patienten, die unter dem Verdacht eines kolorektalen Karzinoms operiert worden waren, mussten 12 aufgrund der Ausschlusskriterien nachträglich aus der Studie heraus genommen werden. Bei fünf der verbleibenden Patienten konnte aus den paraffingebetteten Tumoren keine für die PCR geeignete DNA isoliert werden. Dies ist auf die starke Fragmentierung der DNA durch die Einbettung in Paraffin, die Vorbehandlung mit Formalin (Hajashi et al., 1994) und die fehlende Inaktivierung von DNAsen (Span et al., 1996) zurückzuführen. Von den verbleibenden 75 Patienten litten 74 an einem kolorektalen Karzinom und ein Patient an einem dysplastischen Polyp.

Bei 19 von 74 Tumoren konnte eine *K-ras*-Mutation mit der MASA nachgewiesen werden. Mit 26% liegt der Anteil unter dem in der Literatur beschriebenen von 27-50% (Bos et al., 1987 und 1989; Forester et al., 1987; Vogelstein et al., 1988; Shaw et al., 1991; Finkelstein et al., 1993; Olschwang et al., 1997; Font et al., 2001; Bleeker et al., 2001). In einer Multizenterstudie unter Einschluss von 2721 Patienten lag der Anteil bei 37% (Andreyev et al., 1998). Jass et al. (2002) kamen auf einen Anteil von 35% im Rahmen einer Metaanalyse mit insgesamt 2180 Karzinomen. Der deutlich höhere Anteil in einigen Arbeiten kann durch den Einbezug von Patienten mit Rezidiven begründet sein (Benhattar et al., 1993). Die RASCAL-Studie ergab eine deutlich höhere Rezidivrate bei Patienten mit *K-ras* positiven Tumoren. Der deutlich niedrigere Anteil in dieser Arbeit ist zum Teil durch eine geringe Fallzahl und der damit verbundenen statistischen Schwankung zu erklären. Zu dem wurden nur sieben, der in der Literatur beschriebenen neun relevanten Mutationen, untersucht. Der prozentuale Anteil der *K-ras*-Mutationen, der in der RASCAL-Studie mit der MASA oder vergleichbaren Methoden nachgewiesen wurde, lag mit 32% niedriger, als mit anderen Methoden. 6% der Mutationen befanden sich im Kodon

13, jedoch nur 1% bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutation von Glycin zu Aspartat. Zieht man also von den 32% die nicht untersuchten Mutationen in ihrer prozentualen Häufigkeit ab, liegt diese Arbeit mit 26% nur geringfügig unter dem zu erwartenden Anteil. Zuletzt kann die unterschiedliche Häufigkeit der Tumorstadien eine Rolle spielen. Der Anteil der Tumorstadien I und IV lag in der RASCAL-Studie (Andreyev et al., 1998) mit 15 und 10% niedriger, als in der vorliegenden Arbeit (28 und 16%), die der Tumorstadien II und III mit 43 und 31% jedoch etwas höher (35 und 21%).

Um einen methodischen Fehler als Ursache des niedrigen Anteils von *K-ras*-Mutation auszuschließen, wurden 15 Tumor-DNA-Proben im Bereich des Kodon 12 und 13 des *K-ras*-Gens sequenziert. Schon in der Sequenzierung einer Verdünnungsreihe von Tumorzellen mit bekannter *K-ras*-Mutation zeigte sich, dass der Nachweis von *K-ras*-Mutationen nur bis zu einer Verdünnung von einer Tumorzelle auf 5 Wildtypzellen sicher war. Nur drei der fünf in der Tumor-DNA mit der MASA nachgewiesenen *K-ras*-Mutationen bestätigten sich in der Sequenzierung. Eine mit der Sequenzierung nachgewiesene Mutation ließ sich weder mit der MASA noch mit der TTGE-Analyse bestätigen, so dass es sich dabei am ehesten um ein falsch positives Ergebnis handelt. Bei der direkten Sequenzierung des PCR Produktes der Tumor-DNA auf *K-ras*-Mutationen kam es bei Newton et al. (1989) durch zu hohen Anteil an Wildtyp-DNA von Nichttumorzellen und heterozygoten *K-ras*-Mutationen (Fox et al., 1998) nur zum Nachweis von 50% der Mutationen, die durch das Amplification refractory mutation system (ARMS) nachgewiesen wurden.

In der TTGE-Analyse von 30 Tumoren ließen sich alle sechs der in der MASA nachgewiesenen *K-ras*-Mutationen bestätigen. Zusätzlich zeigte sich eine Mutation, die am ehesten einer in der MASA nicht untersuchten Mutation entspricht. Die untere Nachweisgrenze für *K-ras*-Mutationen in Wildtyp-DNA der TTGE-Analysen betrug unter ähnlichen Bedingungen 1 zu 100 für die Heteroduplex und 1 zu 10 für die Homoduplex (Bjorheim et al., 1998; Cotton, 1993).

In der DNA aus Blut von Patienten, deren Tumoren eine *K-ras*-Mutation aufwiesen, ließ sich in zwei Proben eine Mutation nachweisen. Es handelte sich um eine Mutation von GGT zu GTT (Glycin zu Valin) und GGT zu GAT (Glycin zu Aspartat). Dies entspricht bei der unteren Nachweisgrenze der MASA von 10^2 pro Milliliter Blut dem indirekten Nachweis von mehr als 100 Tumorzellen in einem Milliliter Blut. Beide Patienten wurden an einem Rektumkarzinom im Stadium II bzw. III operiert. In der Nachsorge ergab sich kein Rezidiv, beide Patienten lebten noch nach einer

Nachbeobachtungszeit von 72 und 60 Monaten. Mit der Cytokeratin 20 Reverse-Transkriptase-PCR wiesen Nakamori et al. (1997) bei gleicher Nachweisgrenze in einer von 35 Blutproben Tumorzellen nach.

Durch die DNA-Isolation mit dem Blood and Cell Culture DNA Kit ist eine Kontamination durch DNA im Serum weitestgehend auszuschließen. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da zurzeit untersucht wird, ob der Nachweis von mutierter DNA im Serum von prognostischer Bedeutung ist (Kopreski et al., 1997; De Kok et al., 1997; Hibi et al. 1998; Ryan et al., 2003). Lecomte et al. (2002) wiesen mit der MASA *K-ras*-Mutationen in einem Verhältnis von 1 zu 1000 im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom nach und stellten einen negativen Zusammenhang zur Prognose her.

Die MASA ist eine einfache, nicht radioaktive Methode zum Nachweis von *K-ras*-Mutationen bis zu einer Verdünnung von einer mutierten Zelle auf 10^3 bis 10^4 Wildtypzellen. Bei extremer Steigerung der Empfindlichkeit kommt es gehäuft zu falsch positiven Ergebnissen. Über die unterschiedlichen Nachweisgrenzen, bezüglich unterschiedlicher Basenpaarungen mit unterschiedlich starker Bindungsenergie, liegen noch zu wenige Arbeiten vor. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Nachweisgrenzen von den möglichen Basenpaarungen abhängig sind. Vor weiteren klinischen Anwendungen der MASA ist hier noch weitere Grundlagenforschung nötig. Zum Nachweis von *K-ras*-Mutationen im Gewebe mit einem hohem Anteil mutierter Zellen ist sie weniger gut geeignet, da der Anteil an nachgewiesenen Mutationen bei anderen Methoden, wie der TTGE-Analyse oder der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse deutlich höher lag (Losi et al., 1996; Andreyev et al., 1998). Gelang der Tumorzellnachweis im klinischen Teil dieser Arbeit trotz einer Nachweisgrenze von 100 Tumorzellen auf einen Milliliter Blut, so ist doch eine weitere Absenkung der Nachweisgrenze für weitere Untersuchungen nötig. Denkbar wäre hier eine Anreicherung der Tumorzellen vor der DNA-Isolierung. Shibata et al. (1998) und Iinuma et al. (2000) wiesen über eine immunomagnetische Anreicherung von CD45 positiven Zellen und einer Nested-MASA 10 Tumorzellen auf 10^7 Wildtypzellen nach.

Mit einer Häufigkeit von 37% beim kolorektalen Karzinom (Andreyev et al., 1998) scheint die *K-ras*-Mutation zum Nachweis von Tumorzellen im Blut beim kolorektalen Karzinom in der Klinik für sich allein genommen ungeeignet. Durch den zusätzlichen

Nachweis anderer Mutationen, z.B. im *p53* Gen, ließe sich dieses Problem reduzieren (Iinuma et al., 2000).

Eine Aussage über die prognostische Bedeutung des Nachweises von disseminierten Tumorzellen ist in dieser Arbeit aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht möglich. In neueren Arbeiten, mit Nachweisgrenzen bis zu einer Tumorzelle auf 10^6 Wildtypzellen, zeichnet sich überwiegend ein negativer prognostischer Wert von disseminierten Tumorzellen im Blut beim kolorektalen Karzinom ab (Soeth et al., 1993; Hardingham et al., 1993 und 1995; Denis et al., 1997). Wyld et al. (1998) konnten hingegen keinen Zusammenhang herstellen. Ob dieser Unterschied jedoch klinisch relevant ist oder nicht, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

5. Zusammenfassung

Die klinische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen im peripheren Blut beim kolorektalen Karzinom ist noch nicht endgültig geklärt. In den 30er Jahren des 20sten Jahrhunderts erstmalig entdeckt, wurden sie anfänglich zytologisch und später immunhistochemisch nachgewiesen. Die Nachweisgrenze ist bei diesen Methoden jedoch gering. Untersucherabhängig ist die Zahl der falsch positiven Ergebnisse unterschiedlich hoch. Widersprüchliche Angaben zur Prognose können hier ihre Ursache haben. Mit der MASA liegt ein einfaches, nicht radioaktives Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen über *K-ras*-Mutationen vor. Die kleinste Nachweisgrenze in der vorliegenden Arbeit lag bei 100 Tumorzellen auf einen Milliliter Blut mit $4,1 \times 10^6$ kerntragenden Zellen. Dieses Ergebnis wurde durch Variation von Reaktionszeiten und Temperatur, der Magnesiumionenkonzentration, der dNTP-Konzentration, der Templet-DNA, der Pufferkomponenten und durch den Vergleich unterschiedlicher Polymerasen erreicht. Hier konnte durch Einsatz der *Qia-Taq* und den Zusatz von Ammoniumionen zum PCR-Puffer eine deutliche Steigerung der Nachweisgrenze erreicht werden. Probleme bereitete die Optimierung mit Primern mit einem C zu T Basenmismatch am 3'-Ende des Upstreamprimers, so dass zwei Primer im klinischen Teil der Arbeit nicht eingesetzt wurden. Hier ist vor dem Einsatz der MASA noch weitere Grundlagenforschung zu leisten.

Im klinischen Teil wurden 74 kolorektale Karzinome mit der MASA untersucht. Bei 19 (26%) konnte ein *K-ras*-Mutation nachgewiesen werden. Im Vergleich zur MASA zeigte sich die Sequenzierung deutlich unzuverlässiger, mit der TTGE-Analyse konnte jedoch ein höherer Anteil an *K-ras*-Mutationen nachgewiesen werden.

Präoperativ entnommene Blutproben von den Patienten, in deren Karzinom eine *K-ras*-Mutation nachgewiesen werden konnte, wurden mit der MASA untersucht. In zwei Blutproben konnten so disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Fallzahl ist eine prognostische Aussage nicht zu treffen. Beide Patienten lebten nach 72 und 60 Monaten Nachbeobachtung.

Durch eine Anreicherung der Tumorzellen vor der DNA-Isolation ließe sich die untere Nachweisgrenze noch weiter absenken. Dies ist ein viel versprechender Ansatz in weiteren Untersuchungen zu disseminierten Tumorzellen im Blut mit der MASA.

6. Material

6.1. Einwegmaterial

1,5 ml Cups (*Greiner Bio-one*, Frickenhausen)

14 ml Falcontube (*Greiner Bio-one*, Frickenhausen)

50 ml Falcontube (*Greiner Bio-one*, Frickenhausen)

200 µl PCR-Cups (*Greiner Bio-one*, Frickenhausen)

1 ml Schraubcups (*Greiner Bio-one*, Frickenhausen)

Blood and Cell Culture DNA Kit 100/: [enthält **Genomic-Tips**, **Cell Lysis Buffer C1**, **General Lysis Buffer G2**, **Equilibration Buffer QBT**, **Elutions Buffer QF**, **Wash Buffer QC**, **Protease**, **RNAse**] (*Qiagen*, Hilden)

Einweghandschuhe: Peha Soft (*Hartmann*, Heidenheim)

Kryogefäß: Cryos (*Greiner bio-one*, Frickenhausen)

Kulturflasche: Nunclon TN Surface 200 ml (*Nalge Nunc*, Roskilde, Dänemark)

Monovette: Ammoniumheparin-Monovette (*Sarstedt*, Nümbrecht)

Pipettenspitzen: 10 µl, 100 µl, 1000 µl und 2000 µl DNase/RNase freie Biosphere Filter Tip (*Sarstedt*, Nümbrecht)

6.2. Chemikalien und Lösungen

10X PCR Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl (*GibcoBRL*, Eggenstein)

50 X TAE-Puffer: Tris Base 242 g (*Gibco-BRL*, Eggenstein), Eisessig 1 ml (*Merck*, Darmstadt), EDTA 29,2 g (*Gibco-BRL*, Eggenstein) auf 1 l H₂O pH 8,3-8,5

Agarosegel: 2% (w/v) Ultrapure Agarose (*Gibco-BRL*, Eggenstein) auf TAE Puffer;

Ammoniumacetat: 5 mM (*Merck*, Darmstadt)

Ampli-Taq Stoffelfragment: DNA-Polymerase 5 U/μl (*Perkin and Elmer*, Mannheim)

Cell Lysis Buffer C1: 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 (*Qiagen*, Hilden)

Chloroform: Chloroform reinst (*Merck*, Darmstadt)

DNA-Längenstandard: Molekulargewichtsmarker Nr. XIII, DNA-Konzentration: 250μl/ml, 15 doppelsträngige DNA Fragmente in 50 bp Abständen von 50 bis 750 bp, Bande 250 und 500 sind zwei bis dreifach verstärkt, eine zusätzliche Bande bei 2642 bp (*Boehringer, Mannheim*)

dNTP: Ultrapure 3'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate, Konzentration 100mM, (*Pharmacia*, Freiburg)

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

Entwicklerlösung: 1,5% (v/v) NaOH-Formaldehyd (*Merck*, Darmstadt)

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

Ethidiumbromid: Ethidiumbromid 10 mg/ml (*Roth*, Karlsruhe)

Fixierlösung: 10% (v/v) Methanol (*Merck*, Darmstadt), 0,5% (v/v) Essigsäure (*Merck*, Darmstadt)

General Lysis Buffer G2: 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 (*Qiagen*, Hilden)

H₂O: Das Wasser das in den Versuchen eingesetzt wurde, wurde über eine Millipore-Säule aufbereitet. Es wurde bei 121°C und 2 bar für 3 h nach Herstellerprotokoll autoklaviert

Isoamylalkohol: Isoamylalkohol pro Analyse (*Merck*, Darmstadt)

Kochsalzlösung: NaCl 0,9% (w/v) (*B. Braun*, Melsungen)

λ-DNA: DNA 25 µg/µl, 48 kb Länge (*Roch*, Mannheim)

Laufpuffer: 1,25 X TAE Puffer

Lugolsche Lösung: Lugolsche Lösung (*Sigma*, Deisenhofen); **Mikrodismembrator:** Mikro Dismembrator II (*B. Braun*, Melsungen)

Magnesiumchloridlösung: 50 mM Magnesiumchlorid (*GibcoBRL*, Eggenstein)

Mineralöl: Chile Out Wax (*Biozym*, Oldendorf)

Nachentwickler: 0,75 % (w/v) Na₂CO₃ (*Merck*, Darmstadt)

Natriumacetat: Natriumacetat 3 M, pH 5 (*Merck*, Darmstadt)

PBS-Puffer: Phosphate Buffered Saline (*PAA Laboratories*, Linz, Österreich)

PCR-Puffer sine MgCl₂: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl

PCR-Wachs: Chill out Wax (*Biozym*, Oldendorf)

Pfu-Polymerase: DNA-Polymerase 5 U/µl (*Promega*, Mannheim)

Polyacrylamidgel: 10% (w/v) Acrylamid/Bis (*Gibco-BRL*, Eggenstein), 7 M Harnstoff (*Merck*, Darmstadt), 1,25 X TAE-Puffer, 30 ml Acrylamidlösung mit 270 µl 10% (w/v) Amminopersulfat (*Gibco-BRL*, Eggenstein) + 27 µl TEMED

Primer: Primersynthese durch *MWG-Biotech*, HPLC gereinigt und lyophilisiert (*MWG-Biotech*, Ebersberg) (*GibcoBRL*)

Promega 10X Reaction Buffer: 200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 mg/ml nucleasefreies BSA, 1% (w/v) Triton X-100 (*Promega*, Mannheim)

Protease: Protease 20 mg/ml, Aktivität: 45 mAU/mg, lyophilisiert (*Qiagen*, Hilden)

Proteinase K: Proteinase ohne DNase oder RNase, Aktivität 600 mAU/ml (*Qiagen*, Hilden)

Qia-Taq: DNA-Polymerase 5 U/µl (*Qiagen*, Hilden); **Qia 10X PCR-Puffer:** 10X PCR-Puffer, Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂, pH 8,7 (*Qiagen*, Hilden)

RNase: RNase A 100 ng/ml (*Qiagen*, Hilden)

Scanner: Duoscan T1200 (*AGFA*, Köln); **Silbernitratlösung:** 0,1% (w/v) AgNO₃ (*Merck*, Darmstadt)

Schwerelösung: Xylencyanol 0,25% (v/v), EDTA 0,1% (w/v), Saccharose 40% (v/v) (*Merck*, Darmstadt) in H₂O

Sequenziergel: 41 cm Länge, 0.25 mm Dicke: 6,5 ml Long Ranger 50% (*Biozym*, Oldendorf), 21 g Harnstoff (*Sigma*, Deisenhofen), 5 ml 10X TBE Long Run [aus 1340 mM Tris Base (*Merck*, Darmstadt), 450 mM Borsäure (*Sigma*, Deisenhofen), 25mM EDTA (*Gibco-BRL*, Eggenstein), H₂O ad 1 Liter (pH 8,3 – 8,7)], 30 ml H₂O; 500 µl DMSO (*Sigma*, Deisenhofen); 50 µl TEMED (*Gibco-BRL*, Eggenstein), 350 µl Ammoniumpersulfat 10% (*Sigma*, Deisenhofen)

Stop/Loading Buffer: 10 mM EDTA, Formamid, Bromphenolblau (*Amersham, Braunschweig*)

TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer): 40 mM Tris (*Gibco-BRL, Eggenstein*), 40 mM Na-Acetat (*Gibco-BRL, Eggenstein*), 2 mM EDTA (*Gibco-BRL, Eggenstein*), in H₂O auf pH 8,5

Taq-Polymerase: DNA-Polymerase 5 U/ μ l (*GibcoBRL, Eggenstein*)

TE-Puffer: 10 mM Tris-Cl pH 8,0 (*Merck, Darmstadt*), 1 mM EDTA pH 8,0 (*Merck, Darmstadt*)

Thermosequenzierung: 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-Mercaptoetanol, dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-dGTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA Polymerase (*Amersham, Braunschweig*)

Trypanblau: Trypan Blue Solution 0,4% (*Sigma, Deisenhofen*)

Trypsin/EDTA: 0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (*Sigma, Deisenhofen*)

Türk-Lösung: Türk-Lösung (*Merck, Darmstadt*)

Wachstumsmedium: RPMI A640 Medium ohne Glutamin (*GibcoBRL, Eggenstein*) auf 500 ml Gesamtvolumen nach Zusatz von 5 ml Penicillin (10.000 IU/ml) (*GibcoBRL, Eggenstein*) und 5 ml Streptomycin (10.000 UG/ml) (*GibcoBRL, Eggenstein*), 50 ml FKS (Fetal Bowine Serum) (*Clontech, Heidelberg*), 5 ml L-Glutamin (200mM) (*Gibco BRL, Heidelberg*), 3 ml HEPES-Puffer 1 M, pH 6,8-8,2 (*Gibco BRL, Heidelberg*)

Wash Buffer QC: 1.0 M NaCl, 50 mM MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid), pH 7,0, 15% (v/v) Isopropanol (*Qiagen, Hilden*)

Xylol: Xylol reinst (*Merck*, Darmstadt)

6.3. Geräte

Auswertungsprogramme: Base Image; BioEdit 4.8.3. Sequence alignment editor; Li-Cor Version 4.0

Autoklav: Autoklav (*Webeco*, Bad Schwartau)

Brut- und Begasungsschrank: CO₂ Autozero (*Heraeus*, Hanau)

Elektrophoresekammer: horizontale Elektrophoresekammer (*Fröbel*, Lindau)

Fotodokumentationssystem: UV Transilluminator 312 nm (*MWG-Biotech*; Ebersberg, Deutschland)

Mikroskop: Axioskop (*Zeiss*, Jena)

Mikrotom: Jung SM 2000R (*Leica*, Nussloche)

Neubauerzählkammer: Neubauerzählkammer (*Brand*, Ludwigshafen)

Photometer: DU 640 Spectrophotometer (*Beckmann Coulter*, Fullerton, USA)

Pipetten: Eppendorf Research und Eppendorf Reference für 10 µl, 10 µl, 1000 µl und 2000 µl (*Eppendorf*, Hamburg)

Pipettierhilfe: Pipetus (*Hirschmann*, Eberstadt)

Sequenzierer: DNA Sequencer 4000L (*Li-Cor MWG-Biotech*, Ebersberg)

Spannungsquelle: Power Pac300 (*Bio Rad*, München)

Sterilbank: Class II Typ A/B3 (*Nuair*, Plymouth, USA)

Thermocycler 1: Thermocycler 1 (*Perkin and Elmer*, Mannheim)

Thermocycler: Primus 96 plus (*MWG-Biotech*, Ebersberg)

Thermomixer: Thermomixer Compact (*Eppendorf*, Hamburg)

TTGE-Kammer: Dcode Universal Mutation Detection System (*Bio Rad*, München)

Wärmebad: Wärmebad (*GFL*, Burgwedel)

Zentrifugen: Megafuge 1.0R und Biofuge 22R (*Heraeus*, Hanau)

7. Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
5-FU	5-Fluoruracil
A	Adenin
APS	Ammonimpersulfat
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CK	Zytokeratin
CEA	karzinoembryonales Antigen
cm	Zentimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	DNA spaltendes Enzym
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Differenzierungsgrad eines Tumors
G	Guanin
GAP	Glyzerinaldehydphosphat
GDP	Guanidinphosphat
GTP	Guanidintriphosphat
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HNPPC	Hereditäres Nichtpolypöses Kolonkarzinom Syndrom

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Metastasierungsgrad
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N	Lymphknotenbefall
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p	histopathologischer Befund
PBS	Phosphat bufferd saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
U	Umdrehungen
U	Einheiten
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
T	Tumorausdehnung
T	Thymin
TAE	Tris Acetat EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
v	Volumen
w	Gewicht

8. Literatur

1. Ahnen DJ: Genetics of colon cancer. *West J Med* 154, 700-705 (1991)
2. 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)
3. Andreyev HJ und Cunningham D: Micrometastases: are they clinically significant disease? *Gut* 40, 555-556 (1997)
4. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR und Clarke PA: Kirsten *ras* mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 90, 375-384 (1998)
5. Benhattar J, Losi L, Chaubert P, Givel JC und Costa J: Prognostic significance of *K-ras* mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 104, 1044-1048 (1993)
6. BJORHEIM J, LYSTAD S, LINDBLOM A, KRESSNER U, WESTRING S, WAHLBERG S, LINDMARK G, GAUDERNACK G, EKSTROM P, ROE J, THILLY WG und BORRESEN-DALE AL: Mutation analyses of *K-ras* 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)
7. BLEEKER WA, HAYES VM, GARRENBOLD A, HOFSTRA MW, VERLIND E, HERMANS J, POPPEMA S, BUYS CH und PLUKKER TM: Prognostic significance of *K-ras* and *TP53* mutation in the role of adjuvant chemotherapy on survival in patients with Dukes C colon cancer. *Dis Colon Rectum* 44, 358-363 (2001)
8. BÖHME K, FACIUS D, FARTMANN B, HUBER J und NIKOLEIT K: Sequencing Brochure. *MWG-Biotech Europe*, Ebersberg, Version 3 (1997)
9. BONNHEIM DC, PETRELLI NJ, HERRERA L, WALSH D und MITTELMAN A: Osseous metastases from colorectal carcinoma. *Am J Surg* 151,457-459 (1986)

10. Bos JL: *Ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689 (1989)
11. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR et al.: Prevalence of *ras* mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293-297 (1987)
12. Broll R, Windhövel U, Schiedeck Th, Duchrow M und Bruch HP: Immunzytochemischer und molekularer Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark, der Peritoneallavage, dem Blut und den regionären Lymphknoten. *Zentralbl Chir* 124, 286-291 (1999)
13. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R und Kanz L: Mobilisation of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 83, 636-640 (1994)
14. Carpenter KM, Durrant LG, Morgan K, Bennett D, Hardcastle JD und Kalsheker NA: Greater frequency of *K-ras* Val-12 Mutation in colorectal cancer as detected with sensitive methods. *Clin Chem* 42, 904-909 (1996)
15. Chang A: Colorectal Cancer. Aus Greenfield LJ, Mulholland MW, Oldham KT und Zelenock GB: *Surgery, Scientific principles and practice*. Philadelphia 1014-1031 (1999)
16. Chang SC: Haematoxylin-eosin staining of plastic-embedded tissue sections. *Arch Pathol* 93, 344-351 (1972)
17. Chen ZY und Zarbl H: A nonradioactive, allele-specific polymerases 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)
18. Cooper D, Schermer A und Sun TT: Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications and limitations. *Lab Invest* 52, 243-255 (1985)

19. Cotton RG: Current methods of mutation detection. *Mutat Res* 285, 125-144 (1993)
20. Denis MG, Lipart C, LeBorgne J, LeHur PA, Galmich JP, Denis M, Ruud E, Truchaud A und Lustenberger P: Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 74, 540-544 (1997)
21. Dix BR, Robbins PD, Spagnolo DV, Padovan GL, House AK und Iacopetta BJ.: Clonal analysis of colorectal tumors using *K-ras* and *p53* gen mutations as markers. *Diagn Mol Patho* 4. 261-265 (1995)
22. Dukes CE: The classification of cancer of the rectum. *J Path Bact* 35, 323-332 (1932)
23. Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM und Weinberg RA: Association of Sos *Ras* exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363, 45-51 (1993)
24. Eisenberg B, Decosse JJ, Harford F, Michalek J: Carcinoma of the colon and rectum: the natural history reviewed in 1704 patients. *Cancer* 49, 1131-1134 (1982)
25. Engell HC: Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation. *Acta Chir Scand Suppl* 201, 1-70 (1955)
26. Engell HC: Cancer cells in the blood. A five to nine year follow up study. *Ann Surg* 149, 475-461 (1959)
27. Fearon ER und Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767, (1990)

28. Fearon ER: *K-ras* gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human Cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 1978-1980, (1993)
29. Fidler IJ: The 7th Jan Waldenstrom Lecture. The biology of human cancer metastasis.. *Acta oncol* 30, 669-675 (1991)
30. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S und Swalsky PA: Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behaviour correlates with *K-ras-2* mutation type. *Cancer* 71, 3827-3838 (1993)
31. 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)
32. Fisher ER, Sass R, Palekar A, Fisher B, Wolmar N et al.: Dukes classification revisited: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (Protocol R-01). *Cancer* 64, 2354-2360 (1989)
33. Font A, Abad A, Monzó M, Sanchez JJ, Guillot M, Manzano JL, Pinol M, Ojanguren I und Rosell R: Prognostic value of *K-ras* mutations and allelic imbalance on chromosome 18p in patients with resected colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 549-557 (2001)
34. 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. *British Journal of Cancer* 77, 1267-1274 (1998)
35. Fukushima T und Takenoshita S: Colorectal carcinogenesis. *J Med Sci* 47, 1-11 (2001)
36. Giacchetti S, Itzhaki M, Gruia G, Adam R, Zidani R, Kunstlinger F, Brienza S, Alafaci E, Bertheault-Cvitkovic F, Jasmin C, Reynes M, Bismuth H, Misset JL

- und Levi F: Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery. *Ann Oncol* 10, 663-669 (1999)
37. Glaves D: Correlation between circulating cancer cells and incidence of metastases. *Br J Cancer* 48, 665-673 (1983)
38. Glaves D, Huben RP und Weiss L: Haematogenous dissemination of cells from human renal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 54, 32-35 (1988)
39. Gnanasampanthan G, Elsaleh H, McCaul K und Iacopetta B: *Ki-ras* mutation type and the survival benefit from adjuvant chemotherapy in Dukes' C colorectal cancer. *J Pathol* 195, 543-548 (2001)
40. Hamilton SR: Colon cancer testing and screening. *Arch Pathol Lab Med* 123, 1027-1029 (1999)
41. Hardingham JE, Kotasek K, Farmer B, Butler RN, Mi JX, Sage RE und Dobrovic A: Immunobead-PCR: A technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 53, 3455-3458 (1993)
42. Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE, Eaton MC, Pascoe VH und 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)
43. Harris S und Jones DB: Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci* 54, 166-173 (1997)
44. Hasegawa Y, Takeda S, Ichii S, Koizumi K, Maruyama M, Fujii A, Ohta H, Nakajima T, Okuda M, Baba S und Nakamura Y: Detection of *K-ras* mutations in DNA isolated from faeces of patients with colorectal tumors by mutant allele specific amplification (MASA). *Oncogene* 19, 1441-1445 (1995)

45. Hashimoto T, Kobayashi Y, Ishikawa Y, Tsuchiya S, Okumura S, Nakagawa K, Tokuchi Y, Hayashi M, Nishida K, Hayashi S, Hayashi J und Tsuchiya E: Prognostic value of genetically diagnosed lymph node micrometastasis in non-small lung carcinom cases. *Cancer Res* 60, 6472-6478 (2000)
46. Hayashi N, Arakawa H, Nagase H, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, Takano S, Ogawa M und Makamura Y: Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. *Cancer Res* 54, 3853-3856 (1994)
47. Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S, Watanabe H, Ogawa M, und Nakamura Y: Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer . *Lancet* 345, 1257-1259 (1995)
48. Hayashi N, Ehami H, Kai M, Kurusu A, Takano S und Ogawa: No-touch isolation technique reduces intraoperative shedding of tumor cells into the portal vein during resection of colorectal cancer. *Surgery* 125, 369-374 (1999)
49. Heppner GH und Miller FR: The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol* 177, 1-56 (1998)
50. Hermanek P, Scheibe O, Spiessl B und Wagner G: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 2. Auflage. Berlin, Springer-Verlag (1992)
51. Hibi K, Robinson RC, Booker S, Wu L, Hamilton SR, Sidransky D und Jen J: Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res* 58, 1405-1407 (1998)
52. Hohenberger W, Nömayr A und Merkel S: Chirurgische Therapie kolorektaler Karzinome. *Internist* 44, 311-321 (2003)
53. Iinuma H, Okinaga K, Adachi M, Suda K, Sekine T, Sakagawa K, Baba Y, Tamaura J, Kumagai H und Ida A: Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell 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)
54. Jackson DP, Lewis FA, Taylor GR, Boylston AW und Quirke P: Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 43, 499-504 (1990)
55. Jass RJ, Young J und Leggertt BA: Evolution of colorectal cancer: Changes of pace and changes of direction. *J Gastroenterol and Hepatol* 17, 17-26 (2002)
56. Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R, Eissner HJ, Riethmueller G und Schildberg FW: Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 14, 1810-1807 (1996)
57. Johnson P, Burchill S und Selby P: The Molecular detection of circulating tumor cells. *Br J Cancer* 72, 268 – 276 (1995)
58. Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N und Ronai Z: Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant *K-ras* genes via “enriched” PCR amplification. *Oncogene* 6, 1079-83 (1991)
59. 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)
60. Khanna M, Park P, Zirvi M, Cao W, Picon A, Day J, Paty P und Barany F: Multiplex PCR/LDR for detection of *K-ras* mutations in primary colon tumors. *Oncogene* 18, 27-38 (1999)
61. Kidd VJ, Wallace RB, Itakura K und Woo SL: Alpha 1-antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. *Nature* 304, 230-234 (1983)

62. Knöpnadel J, Altenhofen L und Brenner G: Epidemiologie und gesundheitsökonomische Bedeutung des Darmkrebses in Deutschland. *Internist* 44, 268-277 (2003)
63. Kok de JB, Van Solinge WW, Ruers TJM, Roelofs RWHM, van Muijen GNP, Willems JL und Swinkels DW: Detection of tumor DNA in serum of colorectal cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest* 57, 601-604 (1997)
64. Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander KE, Lipton A und Gocke CD: Detection of mutant *K-ras* DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 76, 1293-1299 (1997)
65. Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seeber S und Schutte J: Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of haematogenous lung cancer dissemination. *J clin Oncol* 13, 2769-2775 (1995)
66. Kullmann F: Karzinogenese und hereditäre Kolonkarzinome. *Internist* 44, 254-267 (2003)
67. Kwok S und Higuchi R: Avoiding false positive with PCR. *Nature* 339, 237-238 (1989)
68. Lang CA und Ransohoff DF: What can we conclude from the randomized controlled trials of fecal occult blood test screening? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10, 199-204 (1998)
69. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, Micard S, Landi B, Blons H, Beaune P, Cugnenc PH und Laurent-Puig P: Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer* 100, 542-548 (2002)

70. Lehman TA, Sott F, Seddon M, Kelly K, Dempsey EC, Wilson VL, Mulshine JL und Modali R: Detection of *K-ras* Oncogene mutations by polymerase chain reaction-based ligase chain reaction. *Anal Biochem* 239, 153-159 (1996)
71. Leather AJM, Gallegos NC, Kocjan G, Savage F, Smalles CS, Hu W, Boulos PB, Northover JMA und Phillips RKS: Detection and enumeration of circulating tumour cells in colorectal cancer. *Br J Surg* 80, 777-780 (1993)
72. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB 3rd, McCoy CE, Mazur KC und Mabry ND: Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 36 4562-4569 (1976)
73. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J und Riethmüller G: Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 340, 685-689 (1992)
74. 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)
75. Losi L, Roncucci L, Di Gregorio C, De Leon MP and Benhattar J: *K-ras* and *p53* mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol* 178: 259-263 (1996)
76. Litle VR, Warren RS, Moor D und Pallavicini MG: Molecular cytogenetic analysis of cytokeratin 10-labeled cells in primary tumors and bone marrow aspirates from colorectal carcinoma patients. *Cancer* 79, 1664-1670 (1997)
77. 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)
78. Mayhew E und Glaves D: Quantitation of the tumorigenic dissemination and arrested cancer cells. *Br J Cancer* 50, 159-166 (1984)

79. Mayo Clinic, Rochester, MN; Gruppo Italiano di Valutazione Interventi in Oncologia; Fondation Française de Cancerologie Digestive; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group; and University of Siena (Autoren nicht namentlich erwähnt): Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International multicentre pooled analysis of B2 colon cancer trials (IMPACT B2) investigators. *J Clin Oncol* 17, 1356-1363 (1999)
80. Menke MA, Tiemann M, Vogelsang D, Boie C und Parwaresch 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)
81. Miyaki M, Seki M, Okamoto M, et al.: Genetic changes and histopathological types of colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 50. 7166-7173 (1990)
82. Muto T, Bussey HF und Morson BC: The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36, 2251-2270 (1975)
83. Nakamori S, Kameyama M, Furukawa H, Takeda O, Sugai S, Imaoka S und Nakamura Y: Genetic detection of colorectal cancer cells in circulation and lymph nodes. *Dis Colon Rectum* 40(Suppl), 29-36 (1997)
84. Neumaier N, Gerhard M und Wagner C: Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissue-specific genes. *Gene* 159, 43-47 (1995)
85. Nerle C: Allgemeine Grundlagen der klinischen Hämatologie. Bergmann H und Rastetter J: Klinische Hämatologie. 4. Auflage, 1-16, Thieme, Stuttgart (1992)
86. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC und Markham AF: Analysis of many point mutation in DNA. The amplification refractory system (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17, 2503-2516 (1989)

87. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Balladur P, Boudjema K, Bachellier P und Jaeck D: Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Francaise de Chirurgie. *Cancer* 77, 1254-1262 (1996)
88. Olschwang S, Hammelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li YJ, Muzeau F, Girodet J, Salmon PJ and Thomas G: Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 94, 12122-12127 (1997)
89. O'Sullivan GC, Collins JK, Kelly J, Morgan J, Madden M und Shanahan: Micrometastases: marker of metastatic potential or evidence of residual disease? *Gut* 40, 512-515 (1997)
90. Pajkos G, Kiss I, Sandor J, Ember I und Kishazi P: The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of *K-ras* oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res* 20: 1695-1702 (2000)
91. Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M, Braun S, Passlick B, Karg O, Thetter O und Riethmüller G: Immunocytological detection of bone marrow micrometastases in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 53, 1027-1031 (1993)
92. Pool EH und Dunlop GR: Cancer cells in the bloodstream. *Am J Surg* 21, 99-102 (1934)
93. Pox C, Schulmann K, Schmiegel W: Konventionelles und molekulares Screening (Stuhltests). *Internist* 44, 287-293 (2003)
94. Qiagen Genomic DNA Handbook (1999)
95. Qiagen *Taq* PCR Handbook (1997)
96. Ransohoff DF und Lang CA: Screening for colorectal cancer. *N Eng J Med* 325, 27-41 (1991)

97. Rhodes CH, Honsinger C, Porter DM und Sorenson: Analysis of the allele-specific PCR method for the detection of neoplastic disease. *Diagn Mol Pathol* 6, 49-57 (1997)
98. Rich T, Gunderson LL, Lew R, Galdibini JJ, Cohen AM und Donaldson G: Patterns of recurrence of rectal cancer after potentially curative surgery. *Cancer* 52, 1317-29 (1983)
99. Robert Koch Institut: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002) Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Auflage, Saarbrücken, <http://www.rki.de/KREBS>
100. Roberts S, Jonasson O Long L, McGrath R, Mc Grew EA und Cole WH: Clinical significance of cancer cells in the circulating blood: two to five year survival. *Ann Surg* 154, 367-371 (1961)
101. Rosenbaum V und Riesner D: Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys Chem* 26, 235-46 (1987)
102. Ryan BM, Lefort F, McManus R, Daly J, Keeling PWN, Weir DG und Kelleher D: A prospective study of circulating mutant *K-ras2* in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut* 52, 101-108 (2003)
103. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324, 163-166 (1986)
104. Saiki RK, Chang CA, Leveson CH, Warren CT, Boehm CD, Kazazian HH und Erlich HA: Diagnosis of sickle cell anemia and β -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 319, 537-541 (1988)

105. Salisbury AJ, McKinna JA, Griffiths JD und Nanton MC: Circulating cancer cells during excision of carcinomas of the rectum and colon with high ligation of the inferior mesenteric vein. *Surg Gynecol Obstet* 120, 1267-1269 (1965)
106. Sandberg AA und Moore GE: Examination of blood for tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 19, 1-11 (1957)
107. Sanger F, Nicklen S und Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74, 5463-5467 (1977)
108. 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)
109. 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)
110. Schmiegel W, Adler G, Frühmorgen P, Folsch U, Graeven U, Layer P, Petrasch S, Porschen R, Pox C, Sauerbruch T, Schmoll HJ und Zeitz M: Kolorektales Karzinom: Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung – Vorsorge bei Risikopatienten – Endoskopische Diagnostik, Therapie und Nachsorge von Polypen und Karzinomen. *Z Gastroenterol* 38, 49-75 (2000)
111. Schnipper L: Clinical implications of tumor-cell heterogeneity. *N Engl J Med* 314, 1423-1431 (1986)
112. Schön D, Bertz J, Görsch B, Haberland J, Ziegler H, Stegmaier C, Eisinger B und Stabenow R: Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland. 94-104, Verlag Robert Koch-Institut, (1999)

113. Seufferlein T, Lutz MP und Adler G: Multimodale Therapiekonzepte beim Kolonkarzinom. *Internist* 44, 322-335 (2003)
114. Shaw P, Tardy S, Benito E, Obrador A und Costa J: Occurrence of *Ki-ras* and *p53* mutations in primary colorectal tumors. *Oncogene* 6, 2121-2128 (1991)
115. Shibata K, Mori M, Kitano S und Akiyoshi T: Detection of ras gene mutations in peripheral blood of carcinoma patients using CD45 immunomagnetic separation and nested mutant allele specific amplification. *Int J Oncol* 12, 1333-1338 (1998)
116. Sidransky D: Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 278, 1054-1059 (1997)
117. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P und Vogelstein B: Identification of *ras* oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumours. *Science* 256, 102-105 (1992)
118. Sistonen L und Alitalo: Activation of *c-ras* oncogenes by mutations and amplification. *Ann Clin Res* 18, 297-303 (1986)
119. Soeth E, Vogel I, Roder C, Juhl H, Marxsen J, Kruger U, Henne-Bruns D, Gremer B und Kalthoff H: Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transkription PCR. *Cancer Res* 57, 3106-3110 (1993)
120. Sommer SS, Cassady JD, Sobell JL und Bottema CD: A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria. *Mayo Clin Proc* 64, 1361-1372 (1989)
121. 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)

122. 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) 1
123. Talbot RW, Irvine B, Jass JR, Dowd GS und Northover JM: Bone metastases in carcinoma of the rectum: a clinical and pathological review. *Eur J Surg Oncol* 15, 449-452 (1989)
124. Tobi M, Luo FC und Ronai Z: Detection of *K-ras* mutation in colonic effluent samples from patients without evidence of colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 86, 1007-1010 (1994)
125. Traverso G, Shuber A, Levin B, Johnson C, Olsson L, Schoetz DJ, Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW und Vogelstein B: Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 346, 311-320 (2002)
126. Valenzuela DM und Groffen J: Four human cell lines with novel mutations in position 12 of *c-K-ras* oncogene. *Nucleic Acids Res* 14, 843-852 (1986)
127. 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)
128. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM und Bos JL: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532 (1988)
129. Wagner C: CEA (Carcinoembryonales Antigen). In: Thomas L: *Labor und Diagnostik*. 5. erweiterte Aufl., 984-987, TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt (2000)
130. Watanabe H, Ha A, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Motoo Y, Okai T, Toya D, Tanaka N und Sawabu N: *K-ras* mutations in duodenal aspirate without secretin stimulation for scening of pancreatic and billiary tract carcinoma. *Cancer* 86, 1441-1448(1999) 104

131. Warburg O und Christian W: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfragments Enolase. *Biochem Z* 310, 384-421 (1941)
132. Weiss L: Metastatic inefficiencia. *Adv Cancer Res* 54,159-211 (1990)
133. White H und Griffiths JD: Circulating malignant cells and fibrinolysis during resection of colorectal cancer. *Proc R Soc Med* 69, 467-469 (1976)
134. Wittinghofer A und Pai EF: The structure of *Ras* protein: a model for a universal molecular switch. *TIBS* 16, 382-387 (1991)
135. Wittinghofer A, Kuhlmann J und Herrmann C: The small GTP protein binding *Ras*. Max Planck Institute of Molecular Physiology, http://www.mpi-Dortmund.mpg.de/departments/dep1/gtpase/gtpase_detail.php3 (2003)
136. Wood DA: Clinical staging and end results classification: TNM system of clinical classification as applicable to carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 28, 109-114 (1971)
137. 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)
138. Wyld D, Peter S, Perren TJ, Jonas S, Allen-Mersh TG, Wheel-Don J und Burchill SA: Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer* 79, 288-293 (1998)

9. Tabellen

Tabelle 23: Daten der Patienten mit Kolorektalen Karzinomen (Letzte Nachbeobachtung zwischen 8.2003)

Probe	Geburtsdatum	OP-Datum	Alter	TNM-Klassifikation	Stadium	Dukes	Grading	Beobachtungszeitraum	verstorben	Lokalisation
C8	12.05.1925	15.03.1997	71	T3 N0 M0	II	B	G3	34	ja	
C9	23.09.1918	15.03.1997	78	T2 N0 M1	IV	D	G3	34	ja	
C10	02.10.1919	18.03.1997	76	T1 N0 M1	I	A	G3	77	nein	Rectosigmoid
C12	05.12.1939	21.03.1997	57	T2 N0 M0	I	A	G3	77	nein	Aszendens
C13	29.03.1914	24.03.1997	79	T3 N1 M1	IV	D	G3	4	ja	Sigmoid
C15	17.04.1941	07.04.1997	55	T1 N0 M0	I	A	G2	76	nein	Rectum 7-12
C16	22.10.1914	09.04.1997	82	T4 N1 M1	IV	D	G2	15	ja	Sigmoid
C17	23.05.1929	17.04.1997	67	T2 N0 M0	I	A	G3	76	nein	Rectum 7-12
C18	04.08.1945	18.04.1997	51	T3 N2 M0	III	C	G2	76	nein	Rectum >12
C21	30.04.1928	05.05.1997	68	T3 N2 M1	IV	D	G3	1	ja	Rectum 7-12
C22	02.03.1945	06.05.1997	51	T4 N0 M0	II	B	G2	75	nein	re Flexur
C23	18.12.1914	07.05.1997	83	T3 N0 M0	II	B	G2	0	ja	Rectum >12
C24	22.04.1932	21.05.1997	64	T3 N0 M0	II	B	G2	75	nein	Rectum 4-7
C26	10.12.1918	28.05.1997	79	T3 N0 M0	II	B	G3	75	nein	Rectum >12
C27	08.01.1925	28.05.1997	71	T2 n0 m0	II	B	G2	75	nein	Rectum 7-12
C29	25.09.1931	06.06.1997	66	T3 N2 M0	III	C	G2	74	nein	Sigmoid
C30	17.03.1933	12.06.1997	63	T1 N0 M0	I	A	G2	74	nein	Zoecum
C32	02.11.1921	16.06.1997	76	T3 N0 M0	II	B	G2	2	ja	Rectum >12
C33	22.09.1925	23.06.1997	72	T3 N2 M0	III	C	G2	74	nein	Sigmoid
C34	21.04.1942	26.06.1997	54	T3 N0 M0	II	B	G2	74	nein	Rectum 4-7
C35	23.06.1940	30.06.1997	56	T3 N2 M1	IV	D	G2	10	ja	Sigmoid
C36	20.09.1935	30.06.1997	62	Polyp mit Dysplasie				74	nein	Rectum 4-7
C37	14.09.1918	02.07.1997	79	T2 N0 M0	I	A	G2	56	ja	Rectum >12
C38	04.02.1943	07.07.1997	53	T3 N2 M0	III	C	G2	73	nein	Rectum 7-12
C39	10.03.1938	07.07.1997	58	T3 N2 M0	III	C	G2			
C40	28.04.1915	09.07.1997	81	T2 N0 M0	I	A	G2	73	nein	Rectum >12
C44	30.09.1927	21.07.1997	59	T2 N0 M0	I	A	G2	73	nein	Sigmoid
C45	03.07.1913	22.07.1997	84	T3 N2 M1	IV	D	G2	22	ja	Transversum
C48	07.09.1927	04.08.1997	70	T3 N0 M0	II	B	G3	72	nein	Aszendens
C49	07.11.1943	06.08.1997	54	T1 N0 M0	I	A	G2	72	nein	Sigmoid

C51	20.12.1921	27.10.1997	75	T3 N0 M0	II	B	G2	35	ja	Rectum 7-12
C52	23.07.1938	13.11.1997	59	T3 N0 M0	II	B	G2	69	nein	Rectum 7-12
C53	19.04.1928	18.11.1997	69	T3 N0 M0	II	B	G3	33	ja	Transversum
C54	15.10.1939	11.12.1997	58	T2 N1 M1	IV	D	G2	68	nein	
C55	09.05.1944	16.12.1997	53	T3 N2 M1	IV	D	G2	36	ja	Sigmoid
C56	08.05.1927	16.12.1997	70	T3 N1 M0	III	C	G2	7	ja	Rectum 7-12
C58	31.08.1926	10.01.1998	61	T1 N0 M0	I	A	G2	67	nein	Sigmoid
C60	08.03.1925	24.02.1998	72	T3 N0 M0	II	B	G3	66	nein	Aszendens
C61	26.10.1930	07.03.1998	67	T3 N0 M0	II	B	G3	65	nein	Aszendens
C62	04.03.1926	11.03.1998	72	T2 N0 M0	I	A	G2	65	nein	Rectum 4-7
C63	30.08.1937	17.03.1998	60	T2 N0 M0	I	A	G2	65	nein	Rectum >12
C64	22.04.1921	25.03.1998	76	T3 N0 M0	II	B	G2	65	nein	Rectum 4-7
C65	29.01.1925	14.04.1998	73	T4 N0 M0	II	B	G3	2	ja	Zoecum
C66	21.04.1929	16.04.1998	68	T3 N0 M0	II	B	G2	64	nein	Sigmoid
C67	24.11.1923	28.04.1998	74	T4 N2 M0	III	C	G3	20	ja	Aszendens
C68	30.06.1939	07.05.1998	58	T3 N0 M0	II	B	G2	63	nein	Rectosigmoid
C69	29.08.1937	11.05.1998	61	T3 N1 M0	III	C	G2	1	ja	Rectum 4-7
C70	10.04.1939	16.05.1998	59	T3 N0 M0	II	B	G2	63	nein	Analkanal
C73	08.07.1926	24.06.1998	71	T4 N1 M1	IV	D	G2	5	ja	Sigmoid
C74	11.03.1932	08.07.1998	66	T2 N0 M0	I	A	G2	61	nein	Rectosigmoid
C75	18.04.1928	27.07.1998	70	T3 N2 M0	III	C	G3	61	nein	Rectum 4-7
C76	14.12.1923	08.12.1998	74	T3 N0 M0	II	B	G2	56	nein	Sigmoid
C77	13.09.1952	11.12.1998	36	T3 N2 M0	III	C	G3	56	nein	Rectum 7-12
C78	01.04.1935	15.12.1998	63	T1 N0 M0	I	A	G3	56	nein	re Flexur
C79	03.11.1919	06.01.1999	79	T2 N0 M0	I	A	G2	56	nein	Aszendens
C80	16.02.1929	18.01.1999	69	T2 N0 M0	I	A	G3	0	ja	Rectum 4-7
C81	14.12.1916	21.01.1999	82	T3 N0 M0	II	B	G3	55	nein	Deszendens
C82	15.09.1923	23.03.1999	75	T4 N0 M0	II	B	G1	53	nein	Zoecum
C83	22.12.1927	29.03.1999	71	T3 N2 M0	III	C	G2	53	nein	Sigmoid
C84	25.09.1941	30.03.1999	57	T4 N0 M0	II	B	G3	53	ja	Deszendens
C85	20.08.1942	23.04.1999	56	T3 N0 M0	II	B	G2	52	nein	Sigmoid
C86	01.06.1934	19.05.1999	62	T3 N1 M0	III	C	G2	51	nein	Sigmoid
C87	24.02.1911	01.06.1999	88	T2 N0 M0	I	A	G2	50	nein	Rectum 4-7
C88	19.12.1942	08.06.1999	56	T1 N0 M0	I	A	G2	24	ja	Sigmoid
C89	25.03.1922	11.06.1999	77	T3 N0 M0	II	B	G2	50	nein	Rectum >12
C90	08.05.1928	21.06.1999	71	T3 N1 M1	IV	D	G3	19	ja	Rectum 7-12
C91	19.08.1922	07.07.1999	76	T3 N1 M0	III	C	G2	49	nein	Sigmoid
C92	02.09.1945	21.07.1999	53	T2 N0 M0	I	A	G3	49	nein	Rectum >12
C93	26.06.1931	26.08.1999	68	T2 N1 M0	III	C	G2	48	nein	Rectum 4-7
C94	13.12.1948	10.09.1999	50	T3 N1 M0	III	C	G2	47	nein	Sigmoid

C95	29.07.1935	15.09.1999	64	T4 N2 M1	IV	D	G3	0	ja	re Flexur
C96	25.07.1931	25.10.1999	68	T3 N0 M0	II	G	G3	46	nein	Rectum 7-12
C97	17.07.1920	01.11.1999	79	T2 N0 M0	I	A	G2	45	nein	Sigmoid
C98	29.10.1927	08.11.1999	72	T3 N2 M1	IV	D	G2	10	ja	Aszendens
C99	19.02.1924	09.11.1999	75	T3 N0 M0	II	B	G2	33	ja	Zoecum

Tabelle 24: Nachweis von *K-ras*-Mutationen mit der MASA, Sequenzierung und der TTGE-Analyse.

Probe	Nachweis der <i>K-ras</i> -Mutation in Frischtumor DNA mit MASA	Nachweis der <i>K-ras</i> -Mutation in Paraffintumor DNA mit MASA	Sequenzierung	TTGE-Analyse
C8	-	neg.	-	-
C9	-	neg.	-	-
C10	-	GGT=>GTT	-	-
C12	neg.	neg.	neg.	neg.
C13	neg.	neg.	neg.	-
C15	-	neg.	-	-
C16	neg.	neg.	neg.	neg.
C17	neg.	-	neg.	neg.
C18	neg.	neg.	neg.	neg.
C21	-	neg.	-	-
C22	-	neg.	-	-
C23	GGT=>GTT	GGT=>GTT	GGT=>GTT	-
C24	-	neg.	-	-
C26	-	GGT=>GAT	-	-
C27	-	neg.	-	-
C29	-	neg.	-	pos.
C30	-	neg.	-	-
C32	neg.	neg.	-	neg.
C33	-	GGT=>GTT	-	-
C34	neg.	neg.	-	-
C35	neg.	-	neg.	neg.
C36	-	GGT=>TGT	-	-
C37	-	neg.	-	-
C38	GGT=>GTT	GGT=>GTT	neg.	-
C39	-	neg.	neg.	-
C40	GGT=>GAT	GGT=>GAT	neg.	pos.

C44	-	neg.	-	-
C45	-	neg.	-	-
C48	neg.	neg.	GGT=>GTT	neg.
C49	-	GGT=>GAT	-	-
C51	GGT=>GTT	-	neg.	pos.
C52	neg.	neg.	neg.	neg.
C53	-	neg.	-	-
C54	-	neg.	-	-
C55	-	neg.	-	-
C56	-	neg.	-	-
C58	-	neg.	-	-
C60	neg.	neg.	neg.	-
C61	neg.	-	-	neg.
C62	-	GGT=>GAT	-	-
C63	-	neg.	-	-
C64	GGT=>GAT	-	GGT=>GAT	pos.
C65	GGT=>GTT	GGT=>GTT	-	pos.
C66	neg.	-	-	neg.
C67	neg.	-	-	neg.
C68	-	neg.	-	-
C69	-	GGT=>GAT	-	-
C70	-	neg.	-	-
C73	-	neg.	-	-
C74	-	neg.	-	-
C75	-	neg.	-	-
C76	neg.	-	-	neg.
C77	neg.	neg.	-	-
C78	-	neg.	-	-
C79	-	neg.	-	-
C80	-	neg.	-	-
C81	neg.	-	-	neg.
C82	GGT=>GAT	-	-	pos.
C83	neg.	-	-	neg.
C84	-	neg.	-	-
C85	neg.	-	-	neg.
C86	neg.	-	-	neg.
C87	neg.	-	-	neg.
C88	-	neg.	-	-
C89	GGT=>GAT	-	-	-
C90	-	GGT=>GAT	-	-

C91	neg.	-	-	neg.
C92	neg.	-	-	neg.
C93	GGT=>GAT	-	-	pos.
C94	neg.	-	-	neg.
C95	neg.	-	-	neg.
C96	neg.	-	-	neg.
C97	neg.	-	-	neg.
C98	GGT=>GAT	-	-	-
C99	-	GGT=>TGT	-	-

Die angegebenen Mutationen beziehen sich auf Kodon 12. „neg.“ entspricht dem fehlenden *K-ras*-Mutationsnachweis der untersuchten Mutationen, „pos.“ entspricht einem *K-ras*-Mutationsnachweis in der TTGE-Analyse, die keiner bestimmten Mutation zugeordnet wurde. DNA-Probe, die mit einer Methode nicht untersucht wurden, sind in der entsprechenden Spalte mit „-“ gekennzeichnet.

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

11. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Rainer Broll für die thematische Grundlage dieser Dissertation, die bereitgestellten Laborräume, die Begleitung während der Ausarbeitung der Arbeit und die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts.

Für die Hilfe bei der Planung, Einarbeitung in die wissenschaftlichen Arbeitsmethoden und die fachliche Betreuung danke ich Frau Dr. Ute Windhövel. Sie war während der gesamten Zeit eine interessierte Betreuerin, die mir jederzeit unterstützend zur Seite gestanden hat. Bei der Durchsicht des Manuskripts war mir ihre Kritik und ihr Engagement eine große Hilfe. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Michael Duchrow, der mir bei methodischen Problemen immer ein zuverlässiger Ansprechpartner war.

Für die Unterstützung bei der Probengewinnung im OP danke ich Herrn Professor Dr. Hans Peter Bruch und seinen Mitarbeitern.

Besonders erwähnen möchte ich auch Frau Regina Kaatz, Frau Gisela Grosser-Pape, Frau Vera Grobleben, Frau Elke Gheribi, Herrn Carsten Pichler und Herrn Dr. Mirko Schmidt. Sie standen mir während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite.

Lars Paulenz möchte ich für die freundschaftliche Unterstützung danken. Die gemeinsame Zeit im Labor hat mir viel Spaß gemacht.

Meiner Frau Katrin Lohmann schulde ich unendlichen Dank für die dauernde Motivation, Unterstützung und konstruktive Kritik während der gesamten Arbeit. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Bei meinen Kindern Caroline und Luise entschuldige ich mich, dass sie allzu häufig auf mich verzichten mussten.

Zuletzt möchte ich meine Eltern danken, die mir mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben. Auf ihre Unterstützung habe ich mich stets verlassen können.

12. Lebenslauf

- 23.02.1972 geboren in Dortmund als 2. Kind der Eheleute Silvia Lohmann (geb. Herfurth) und Dr. Jörg Lohmann
- 1978 - 1983 Gemeinschaftsgrundschule Grefrath
- 1983 - 1992 Luise-von-Duesberg-Gymnasium Kempen, Abschluss: Abitur
- 1992 - 1993 Zivildienst auf der Inneren Station II im Kreiskrankenhaus Wedel
- 1993 - 2000 Studium der Medizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
- 1995 Physikum
- 1996 1. Staatsexamen
- 1997 Beginn der Doktorarbeit im Forschungslabor der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Lübeck bei Prof. Dr. Broll
- 1999 2. Staatsexamen
- 2000 3. Staatsexamen
- 2001 Arzt im Praktikum in der Klinik für Chirurgie, Dr. Went im DRK-Krankenhaus Mölln/Ratzeburg
- 2002 Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin, Dr. Harland im DRK-Krankenhaus Mölln/Ratzeburg