

Carl Christoph Schimanski  
Dr. med.

## **Nachweis humaner K-ras Mutationen in Tumor-, Mukosa- und Lebergewebe zur Detektion disseminierter Tumorzellen beim kolorektalen Karzinom**

Geboren am 30.01.1975

Reifeprüfung am 21.06.1994

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/95 bis WS 2000/2001

Physikum am 10.09.1996 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg / Durham

Staatsexamen am 08.05.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Martin R. Berger

Eine prospektive Studie zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lebergewebe wurde an einer Gruppe von 142 Patienten, die an kolorektalen Karzinomen erkrankt waren, durchgeführt. Der Nachweis von K-ras Mutationen mit einer Sensitivität von 1 K-ras Mutante unter  $10^6$  Wildtyp-Zellen gelang durch Anwendung einer PCR-RFLP Technik. Sie war sensitiver als die von anderen Autoren beschriebenen Techniken. Von den 142 Patienten wurden Tumorgewebe, Mukosaproben und Leberstanzen untersucht. Die Inzidenz von K-ras Mutationen in Tumorgewebe lag bei 46% und entspricht daher Studien anderer Autoren, die von 40%-50%igen Inzidenzen berichten. K-ras mutierte Tumoren zeigten häufiger eine Tendenz zur lokalen Progression (T3/ T4: 49% K-ras Mutationen) als K-ras Wildtyp Tumore (T1/ T2: 29% K-ras Mutationen). In den Tumoren weiblicher Patienten waren K-ras Mutationen häufiger nachweisbar (59%) als in den Tumoren männlicher Patienten (39%). K-ras Codon 12 mutierte Tumore weiblicher Patienten wurden 3,3 Jahre früher diagnostiziert als K-ras Codon 12 Wildtyp Tumore. Aus diesem Grund ging der signifikante Altersunterschied von Männern und Frauen zum Diagnosezeitpunkt für die große Untergruppe der K-ras Codon 12 mutierten Tumore verloren. Daher kann vermutet werden, daß die Entwicklung oder das Wachstum von K-ras Codon 12 mutierten Tumoren bei Frauen keinen geschlechtsspezifischen Faktoren unterliegt. Eine Mutationsanalyse zeigte, daß Codon 12 GCT (17% aller Tumorsequenzen) und GAT (9% aller Tumorsequenzen) die häufigsten Mutationen in Tumorgewebe sind. Durch eine Analyse der Mukosaproben konnte eine 8%ige Inzidenz von K-ras Mutationen in den Mukosaproben aller Patienten festgestellt werden. Mukosagewebe wies nur dann K-ras Mutationen auf, wenn der zugehörige Primärtumor ebenfalls K-ras mutiert war. Wurde für die Entnahme der Tumor- und Mukosaprobe das gleiche Skalpell benutzt (Gruppe A; 48 Patienten), so konnte in 19% aller Mukosaproben (39% bei K-ras mutierten Tumor) eine K-ras Mutation nachgewiesen werden. Wurden separate Skalpelle benutzt (Gruppe B; 76 Patienten), so reduzierte sich diese Häufigkeit auf 3% (6% bei K-ras mutierten Tumoren). Der 11-fache Abfall der Häufigkeit von K-ras Mutationen in der Mukosa bei R0-Resektion von Patienten K-ras mutierter Tumoren (6/ 18 auf 1/ 31) war signifikant ( $p < 0,004$ ). Der entsprechende, nur 3-fache Abfall bei R1/ R2 Resektaten basiert darauf, daß entsprechend der Definition des R1/ R2 Status residuale Tumorzellen bei diesem Status noch erwartet werden können. Beide Ergebnisse unterstützen die Theorie, daß es in Gruppe A durch die Entnahmetechnik zur Kontamination mit mutierter DNA gekommen ist, und damit zu einer relativ höheren Inzidenz von K-ras Mutationen. Sequenzanalysen zeigten, daß fast alle in der Mukosa gefundenen Mutationen Codon 12 GAT Mutationen waren. K-ras mutierte Tumore waren häufiger mit Residualtumor assoziiert als

Wildtyp Tumore und könnten daher zu der Metastasierung kolorektaler Karzinome beitragen. In erstmalig zu diesem Zweck entnommenen Leberbiopsien wies die PCR-RFLP K-ras Mutationen in 22 Fällen nach, von denen 21 mit einem K-ras mutierten Primärtumor (33%, 21/ 64 Patienten) assoziiert waren. Unter den Lebermutationen dominierten Codon 12 GAT- (44%) und GCT- (38%) Mutationen. Somit zeigten Codon 12 GAT Mutationen eine höhere Metastasierungsrate (58%) als GCT Mutationen (25%). Klinische Methoden wiesen in 23% aller Patienten und 22% (14/64) der Patienten mit K-ras mutierten Tumoren Lebermetastasen nach. Die PCR-RFLP wies in 33% (21/ 64) der Patienten dieser Untergruppe Lebermetastasen nach. Sieben der durch klinische Methoden entdeckten Fälle wurden durch PCR-RFLP bestätigt. Andererseits konnten klinische Methoden nur in 7 der 21 durch PCR-RFLP diagnostizierten Fälle ebenfalls Lebermetastasen lokalisieren. Somit ergänzen sich beide Methoden eher, als daß sie in Konkurrenz zueinander stehen. Dies beweist auch die Tatsache, daß Lebermetastasen durch klinische Methoden nur bei T3/ T4 Tumoren, durch PCR-RFLP aber schon bei T2 Tumoren gefunden werden konnten. Kombiniert man beide Methoden, so konnten bei 28 von 64 Patienten mit K-ras mutierten Tumoren Leber(mikro-)metastasen identifiziert werden (44%). Daher könnte die PCR-RFLP zum Nachweis von Lebermetastasierung als sinnvolle Ergänzung zu bisherigen Techniken eingesetzt werden. Sie selektiert eine neue Hochrisiko-Gruppe von Patienten, die zum Teil noch nicht an soliden Metastasen erkrankt sind, aber ein erhöhtes Risiko haben solide Metastasen zu entwickeln. Eine frühe Therapie könnte die infauste Lebenserwartung dieser Untergruppe verbessern.