

Christoph Peter Dieterle  
Dr. med.

## **Nachweis und Quantifizierung K-ras mutierter Zellen in Tumor, Mukosa, Leber, Lymphknoten und Knochenmark von Patienten mit kolorektalem Karzinom.**

Geboren am 25.12.1973 in Oberndorf a./N.  
Reifeprüfung am 17.05.1993 in Oberndorf a./N.  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1996/97 bis SS 2003  
Physikum am 09.09.1998 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Karlsruhe  
Staatsexamen am 06.05.2003 an der Universität Freiburg.

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Martin R. Berger

In der hier vorgelegten, prospektiven Studie wurden intraoperativ gewonnene Proben von 104 Patienten mit kolorektalem Karzinom mittels einer zweiphasigen PCR-RFLP auf K-ras Mutationen untersucht und mutierte Proben anschließend sequenziert. Die PCR-RFLP ist in der Lage, eine mutierte Zelle in  $10^3$ - $10^6$  Wildtypzellen nachzuweisen. Bei den untersuchten Proben handelte es sich um jeweils ein Stück des Tumors, der Mukosa, eine Stanzprobe aus dem linken und rechten Leberlappen, ein para-aortal gelegener Lymphknoten und eine Knochenmarksprobe. Darüber hinaus wurden bei 18 der 104 Patienten außer der standardisierten Tumorprobe aus einem zentral gelegenen Abschnitt vier weitere Proben aus peripheren Abschnitten untersucht, um die Frage zu klären, inwieweit K-ras Mutationen einheitlich im gesamten Tumorbereich vorkommen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine quantitative PCR mit internem Standard entwickelt. Durch den Abgleich mit einer Verdünnungsreihe aus mutierten und Wildtyp Zellen (Verhältnisse der Verdünnungsreihe von 1 : 1 bis 1 :  $10^4$ ) konnte anschließend abgeschätzt werden, in welchem Verhältnis K-ras mutierte Zellen zu Wildtyp Zellen in der jeweiligen Probe vorlagen. Damit sollte die Frage erörtert werden, ob der Anteil K-ras mutierter Zellen eines Tumors sich auf dessen Wachstumsverhalten und die Prognose der Erkrankung auswirkt.

Zu diesen 104 Patienten kamen im selben Zeitraum 95 weitere Patienten hinzu, die in derselben Versuchsanordnung auf K-ras Mutationen im Tumor und Gewebe untersucht wurden. Die Ergebnisse wurden zusammengefasst und zur Publikation eingereicht. Die zusätzlichen Daten wurden hier ebenfalls abgehandelt, da die größere Patientenzahl eine besser gesicherte Aussage über die Ergebnisse zulässt.

Die Detektion von K-ras Mutationen im Tumor zeigte einen Anteil K-ras mutierter Tumoren von 37 %. Davon war der überwiegende Teil in Codon 12 (81 %) und nur 19 % in Codon 13 mutiert. Die häufigste Mutation in Codon 12 war GGT>GAT (Gly>Asp; 35 %), gefolgt von GGT>GTT (Gly>Val; 32%). In Codon 13 kamen nur GGC>GAC (Gly>Asp) Mutationen vor. Die Quantifizierung der K-ras mutierten Tumoren zeigte, dass 72 % einen Anteil K-ras mutierter Zellen von mindestens 1 % hatten. Patienten in höherem Alter (80 Jahre und älter; n=4) hatten einen signifikant höheren Anteil mutierter Zellen als jüngere Patienten. Darüber hinaus korreliert ein hoher Anteil mutierter Zellen (mind. 1 %) mit Lymphknotenbefall (N1/2; p = 0,11), histologisch nachgewiesener venöser Infiltration (V1; p = 0,10) und signifikant mit

postoperativem Tumorresiduum (R1/2;  $p < 0,03$ ) sowie hämatogener Metastasierung (M1;  $p = 0,057$ ).

Mutationen der Mukosa konnten in drei Fällen (1,5 %) nachgewiesen werden. Alle drei Proben zeigten keine Übereinstimmung mit dem Primärtumor. Somit liegt bei diesem Gewebe der Schluss nahe, dass es sich nicht um disseminierte Tumorzellen, sondern um Spontanmutationen handelt. Die Bedeutung für die Entstehung von Zweittumoren bleibt dabei ungeklärt.

K-ras Mutationen in Leber und Lymphknoten wurden in 14 Gewebeproben (13 Patienten) nachgewiesen. 13 Proben zeigten dieselbe Mutation wie der korrespondierende Primärtumor. Somit wurde bei 16 % der Patienten mit K-ras mutiertem Tumor eine korrespondierende Mutation in einem Gewebe nachgewiesen. Daraus muss geschlossen werden, dass es sich bei den mutierten Zellen um ITZ bzw. Mikrometastasen handelt. Eine neue Eingruppierung auf Grund der nachgewiesenen Mikrometastasen ergab sich daraus jedoch nur bei drei Patienten (4 %).

In den 113 untersuchten Knochenmarkproben konnten keine K-ras Mutationen nachgewiesen werden. Gründe dafür sind zum einen in der verminderten Sensitivität ( $1 : 10^3$  im Knochenmarkmodell), andererseits in der vermutlich kleineren Anzahl von Tumorzellen im Knochenmark zu sehen.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Die PCR-RFLP ist eine geeignete Methode zur Charakterisierung eines kolorektalen Tumors hinsichtlich seines K-ras Status. In der Gruppe der K-ras mutierten Tumore, kann die PCR-RFLP weiterhin eingesetzt werden, um isolierte Tumorzellen bzw. Mikrometastasen in extratumoralen Geweben nachzuweisen. Jedoch bedarf es weiterer Biomarker um in der Gruppe der K-ras Wildtyp-Tumoren (hier 63 % aller Tumoren) ebenfalls ITZ nachweisen zu können.

Ein erhöhter Anteil K-ras mutierter Zellen korreliert in dieser Arbeit signifikant mit einigen Parametern erhöhter Tumoraggressivität. Die prognostische Aussagekraft einer solchen Quantifizierung gilt es im Weiteren zu analysieren.