

Magdalena Claudia Kraus

Dr. med.

**Untersuchungen zur Mutationshäufigkeit des Onkogens K-ras in normalem und neoplastisch veränderten Darmgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom und Etablierung der DEN (double enriched nested) – PCR zum sensitiven Nachweis von disseminierten Tumorzellen bei dieser Erkrankung**

Geboren am 27.10.1978 in Lublin

3. Staatsexamen am 07.06.2005 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum

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

Die sensitive Detektion von disseminierten Tumorzellen (DTC) in Organen, in denen Metastasen eines kolorektalen Karzinoms auftreten können, verbessert die Diagnostik zum Grading dieser Tumorart. Erforderlich hierfür sind geeignete molekulare Marker. Bei K-ras mutierten Primärtumoren können die jeweiligen K-ras Mutationen als Marker genutzt werden, um eine Aussaat von disseminierten Tumorzellen nachzuweisen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, drei bereits etablierte PCR-Methoden zur Detektion von K-ras Punktmutationen miteinander im Hinblick auf deren Sensitivität und Zeitaufwand zu vergleichen sowie eine verbesserte Methode zu entwickeln und für den Laboralltag zu etablieren. Die mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse sollten dazu beitragen, das K-ras Onkogen als Marker für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen zu validieren.

Die Punktmutationen in K-ras Codon 12 und 13 wurden zunächst auf ihr Auftreten in verschiedenen Geweben von Patienten mit kolorektalen Karzinom überprüft. Mittels der PCR-RFLP mit nachfolgender Sequenzierung wurde die Inzidenz von K-ras Codon 12 und 13 Mutationen in makroskopisch unauffälliger Mukosa sowie Karzinomproben von 36 Patienten mit kolorekalem Karzinom bestimmt und mit der Inzidenz von K-ras Codon 12 und 13 Mutationen in den Polypen und Karzinomproben eines anderen Kollektivs von 48 Patienten mit kolorektalem Karzinom verglichen. In Mukosagewebe betrug die Ration von K-ras Codon 12 und 13 Mutationen 0,9:1, während in Karzinomproben K-ras Codon 12 Mutationen häufiger zu finden waren (Ratio 14:1;  $p=0,004$ ). Im Polypgewebe des zweiten Patientenkollektivs betrug das Verhältnis von K-ras Codon 12 und 13 Mutationen 2,7:1, während die entsprechenden Karzinomproben ein Verhältnis von 19:1 K-ras Codon 12:13 Mutationen aufwiesen. Die Unterschiede in den relativen Häufigkeiten von K-ras Codon 12 und 13 Mutationen weisen darauf hin, dass die Läsionen zwar einen ähnlichen Ursprung

haben, im Laufe der Karzinomprogression aber die Inzidenz von K-ras Codon 12 Mutationen im Vergleich zu K-ras Codon 13 Mutationen ansteigt.

Zur Validierung des Markers K-ras wurden Gewebeproben von 49 Patienten mit kolorektalem Karzinom auf das Vorhandensein von K-ras Codon 12 Mutationen, die mit einer höheren Aggressivität des Primärtumors und einer schlechteren Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom verbunden sind, untersucht. Die Mutationsinzidenz von K-ras Codon 12 Mutationen wurden in Karzinom-, Leber-, Lymphknotenproben und Knochenmarkgewebe mit der neu entwickelten double enriched nested (DEN-) PCR ermittelt und mit denen verglichen, die aus den Untersuchungen mit drei etablierten Methoden resultierten. Die DEN-PCR mit anschließender Sequenzierung fand eine K-ras Codon 12 mutierte in ca.  $10^7$  K-ras Wildtypzellen und hatte damit eine bessere Nachweisgrenze als die der anderen Methoden ( $1:10^2$ - $1:10^6$ ). Insgesamt enthielten 26 von 46 Karzinomen und eine von drei Adenomen eine K-ras Codon 12 Mutation. Sechzehn dieser Mutationen konnten mit allen Methoden ermittelt werden, zwei mit drei Methoden, acht mit zwei Methoden und eine nur mit der DEN-PCR. In 8 Fällen führte nur die DEN-PCR zu einem Sequenzierergebnis und war somit den anderen Methoden überlegen ( $p=0,002$ ). Acht von 26 Patienten mit einem K-ras Codon 12 mutierten Karzinom wiesen auch K-ras mutierte Zellen in ihrem Leber- und Lymphknotengewebe und 4 Patienten auch in ihrem Knochenmarkgewebe. Die Mutationen in Leber- und Lymphknoten stimmten mit den Mutationen im Primärtumor überein, während die im Knochenmark sich unterschieden.

Die neue double enriched nested (DEN)-PCR konnte insbesondere im Vergleich mit der PCR-RFLP mehr K-ras Mutationen sowohl im Primärtumor als auch in den oben genannten Organen nachweisen. Sie ist innerhalb eines Arbeitstages durchführbar und eignet sich durch ihre hohe Sensitivität zum Nachweis von K-ras Codon 12 Mutationen in Organen, die für eine Metastasenabsiedelung des kolorektalen Karzinoms prädestiniert sind. Durch Entwicklung der DEN-PCR als neue Detektionsmethode für K-ras Codon 12 Mutationen konnte die Detektion von disseminierten Tumorzellen in Leber, Lymphknoten und Knochenmark von Patienten mit kolorektalem Karzinom verbessert werden. Ob der Marker in Form der K-ras Codon 12 Mutation auch im klinischen Alltag zum Nachweis von disseminierten Zellen benutzt werden wird, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten.