

Aus dem  
Institut für Immunologie  
der  
Ludwig-Maximilians Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

**Mutationsanalyse von *TP53*, *KRAS* und *PIK3CA*  
bei einzelnen disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark  
von Karzinompatienten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der  
Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von  
Thomas Blankenstein  
aus  
Bad Harzburg

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Ch. A. Klein

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. med. Ch. Walz

Priv. Doz. Dr. med. M. Schlemmer

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FARC, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

18.04.2013

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis:

Verzeichnis der Abkürzungen	6
1. Einleitung	7
1.1 Minimale residuale Krebserkrankung	7
1.2 Bedeutung der MRD für die Prognose der Tumorerkrankung	7
1.3 Notwendigkeit der weitergehenden molekularen Charakterisierung CK <sup>+</sup> -Zellen	8
1.4 Untersuchte Gene: <i>TP53</i> , <i>KRAS</i> & <i>PIK3CA</i>	9
1.5 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Enzyme	17
2.1.3 Oligonukleotide	18
2.1.4 Antikörper und Färbereagenzien	18
2.1.5 Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien	19
2.1.6 Pufferlösungen und Kulturmedien	20
2.1.7 Tumorzelllinien	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zellkultur	22
2.2.2 DNA-Isolierung	22
2.2.3 Knochenmarkaufarbeitung	22
2.2.4 Immunzytologische Detektion epithelialer Zellen in Knochenmark und Lymphknoten	23
2.2.5 Isolation der detektierten Zellen	25
2.2.6 Lasermikrodissektion	25
2.2.7 Mse-I-PCR	26
2.2.8 Reamplifikation	27
2.2.9 Spezifische PCR	27
2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.11 SSCP	27
2.2.12 Sequenzieren	28
3. Ergebnisse	30
3.1 Sensitivität	30
3.1.1 Signalverlust der Einzelzell-PCR	31
3.1.2 Signalverlust der PCR aus formalinfixiertem und paraffineingebetteten vs. kryokonserviertem Gewebe	36
3.1.3 Etablierung und Sensitivität der SSCP	40
3.1.3.1 Etablierung der SSCP mit Kontrollzelllinien	40

---

3.1.3.2 Kontrolle der SSCP-Bedingungen mit weiteren Zelllinien	42
3.1.4 Allelverlust	43
3.2 Spezifität	45
3.3 <i>TP53</i>	47
3.4 <i>KRAS</i>	62
3.5 <i>PIK3CA</i>	63
4. Diskussion	65
4.1 Methodische Gesichtspunkte	65
4.2 <i>TP53</i> -, <i>KRAS</i> - und <i>PIK3CA</i> -Mutationen in disseminierten Tumorzellen	67
4.3 Vergleich mit den Primärtumoren	68
4.4 Bedeutung für das Verständnis der Metastasierung und für die systemische Therapie	70
5. Zusammenfassung	72
6. Literaturverzeichnis	73
7. Danksagung	82
8. Anhang	83
9. Publikationen	85

## Verzeichnis der Abkürzungen

Formelgrößen wurden mit dem international gebräuchlichen SI-Einheiten und chemische Elemente gemäß ihrer Bezeichnung im Periodensystem abgekürzt.

A	Adenin	kb	Kilobasenpaare
AB-Serum	Serum der Blutgruppe AB	min	Minute
APS	Ammoniumpersulfat	PBL	Peripheral Blood Leucocyte
AS	Aminosäure	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
DTC	disseminierte Tumorzelle (disseminated tumor cell)	PCR	Polymerase Chain Reaction
NTP	Nucleosid-5'-triphosphat	PFA	Paraformaldehyd
bp	Basenpaare	RNA	Ribonukleinsäure
C	Cytosin	SDS	Natriumdodecylsulfat
DNA	Desoxyribonucleinsäure	sec	Sekunde
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'- triphosphat	T	Thymin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	TBS	Tris-buffered Saline
G	Guanin	TEMED	Tetraethylmethyldiamin
g	Erdbeschleunigung (gravity)	Tris	Tris(hydroxymethyl)amino methan
h	Stunde	Upm	Umdrehungen pro Minute

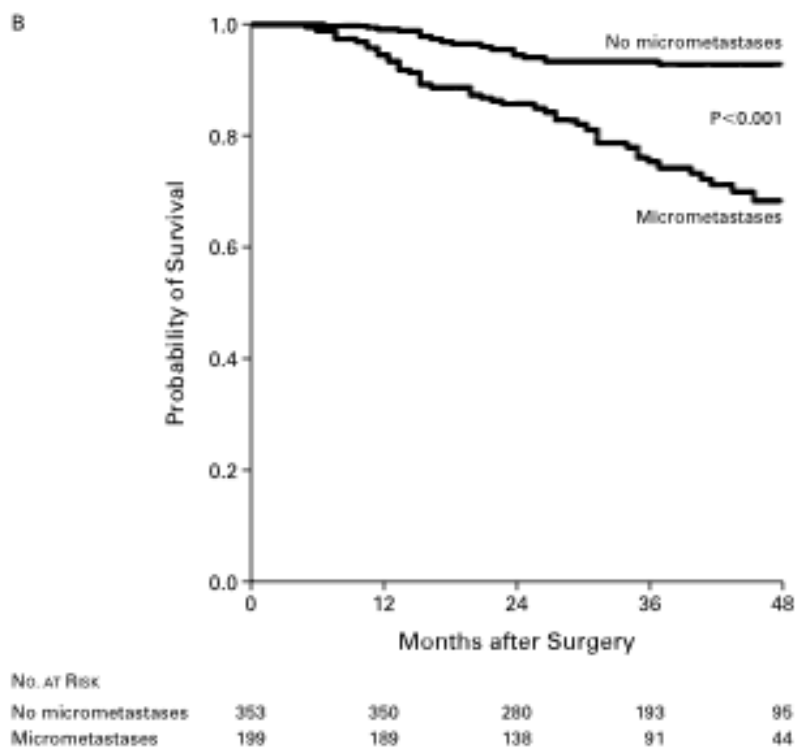
## 1. Einleitung

### 1.1 Minimale residuale Krebserkrankung

Das Vorliegen einer minimalen residuale Krebserkrankung (MRD) wird durch den Nachweis epithelialer Zellen vor allem im Knochenmark von Karzinompatienten bestimmt (Dearnaley *et al.*, 1981; Mansi *et al.*, 1987; Schlimok *et al.*, 1987). Die disseminierten Zellen werden mit Hilfe epithelialer Marker, die in den mesenchymalen Zellen des Knochenmarks und von Lymphknoten sowie im Blut nicht exprimiert werden, detektiert (Pantel *et al.*, 1994). Hierfür werden monoklonale Antikörper gegen epitheliale Zytoskelettbestandteile (A45-B/B3 gegen ein gemeinsames Epitop der Zytokeratine 8, 18 und 19 und CK2 mit einer Spezifität gegen das Zytokeratin 18) oder der Antikörper 3B10-C9 gegen das Oberflächenantigen EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) verwendet.

### 1.2 Bedeutung der MRD für die Prognose der Tumorerkrankung

Die Bedeutung der MRD für die Prognose der Tumorerkrankung ist mittlerweile durch zahlreiche Studien belegt. So konnte für das Mammakarzinom unter anderem von Braun *et*



**Abb. 1: Anstieg der Wahrscheinlichkeit eines tumor-assoziierten Todes bei Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatienten (aus: Braun *et al.*, 2000)**

*al.* (2000) (s. Abb. 1) sowie Gerber *et al.* (2001) gezeigt werden, daß der Nachweis epithelialer Zellen in Knochenmark oder Lymphknoten einen unabhängigen prognostischen Faktor für das krankheitsfreie Überleben wie auch für das Gesamtüberleben darstellt.

Gleiches konnte für das Bronchialkarzinom (Passlick *et al.*, 1994; Pantel *et al.*, 1996), das Prostatakarzinom (Weckermann *et al.*, 2001; Bianco *et al.*, 2001), das Oesophaguskarzinom (Izbicki *et al.*, 1997; Hosch *et al.*, 2000), das Pankreaskarzinom (Thorban *et al.*, 1996; Hosch *et al.*, 1997) sowie für das Colonkarzinom (Lindemann *et al.*, 1992; Leinung *et al.*, 2000) gezeigt werden.

### **1.3 Notwendigkeit der weitergehenden Charakterisierung CK<sup>+</sup>-Zellen**

Erstmals konnte der Beweis, daß es sich bei den im Knochenmark nachgewiesenen epithelialen Zellen tatsächlich um disseminierte Tumorzellen handelt, durch Müller *et al.* (1996) durch den Nachweis einer HER-2/neu-Amplifikation in im Knochenmark von Mammakarzinompatienten detektierten epithelialen Zellen erbracht werden.

Durch die von Klein und Schmidt-Kittler 1999 entwickelte globale Amplifikation des Genoms einer einzelnen Zelle wurde schließlich die molekulare Analyse disseminierter Tumorzellen und damit die detaillierte genomische Charakterisierung einzelner Zellen möglich: Nach Fragmentierung des Genoms durch Verdau mit dem Restriktionsenzym Mse I (Schnittstelle: T<sup>▼</sup>TAA) wird an die durch Mse I generierten 5' TA-Überhänge ein aus zwei Oligonukleotiden bestehender Adapter ligiert, mit Hilfe dessen dann nach Auffüllen der 3' rezessiven Enden der Genomfragment-Adapter eine gleichmäßige Amplifikation des Genoms möglich ist (Details hierzu im „Material und Methoden“-Teil).

Die hierdurch entstehende Möglichkeit, mit einer Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) an einzelnen Zellen chromosomale Gewinne und Verluste genomweit zu erfassen, liefert ein globales Bild aller unbalancierten chromosomalen Veränderungen und kann deswegen wichtige Informationen zur Allelverlusten oder Allel-amplifikationen liefern. So ist durch Schmidt-Kittler *et al.* 2003 die Vorstellung in Frage gestellt worden, ob Metastasierung wirklich ein linearer klonaler Prozeß der fortschreitenden Ansammlung von Aberrationen ist. Bei der Analyse disseminierter Tumorzellen von Brustkrebspatientinnen im Tumorstadium M0 und disseminierter Tumorzellen von Patientinnen im Stadium M1 konnte beim Vergleich mit dazugehörigen mikrodissezierten Primärtumorealen eine nicht nur deutlich geringere Zahl von chromosomalen Aberrationen in disseminierten Tumorzellen von M0-Patientinnen im Vergleich zum Primärtumor, sondern auch eine mehr oder minder zufällig erscheinende, stark heterogene Anordnung der Aberrationen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu nahm mit einem metastasierten Tumorstadium zwar die Zahl der Aberrationen in den disseminierten Tumorzellen zu, die Heterogenität hingegen ab (Klein *et al.*, 2002).



Diese Daten deuten darauf hin, daß Metastasen nicht von dem vorherrschenden Klon des Primärtumors abstammen müssen, sondern möglicherweise Ergebnis eines Selektionsprozesses von Tumorzellen sind, die frühzeitig in die Peripherie ausgewandert sind. Die genetische Heterogenität früher disseminierter Zellen ist deswegen am ehesten als ein weniger stabiler Übergangszustand auf dem Weg zur Selektion eines dominanten, zur Bildung einer manifesten Metastase geeigneten Klons zu sehen (Klein, 2003).

Aufgrund der Heterogenität der disseminierten Tumorzellen, die sich nach vollständiger chirurgischer Entfernung des Primärtumors noch in der Peripherie des Körpers befinden, erscheint auch in der adjuvanten Situation eine systemische Therapie als nicht sicher erfolgversprechend. Denn mit zunehmender Heterogenität steigt auch die Möglichkeit des Vorhandenseins / der Entstehung einer Tumorzellvariante, die sich der Therapie entziehen kann. Um frühesten Veränderungen, die mit größerer Wahrscheinlichkeit in genetisch instabilen Zellen gemeinsam vorhanden sein könnten, auf die Spur zu kommen, erscheint eine Suche nach möglichst frühzeitigen und weitverbreiteten Aberrationen sinnvoll.

Da die CGH aber eine Auflösungsgrenze von 10-20 Megabasenpaaren (Mbp) hat, können kleinere Aberrationen, balancierte Translokationen oder Punktmutationen nicht dargestellt werden. Durch den Nachweis subchromosomaler Allelverluste und Geneamplifikationen konnte aber bereits von Schardt *et al.* (2005) der maligne Charakter von epithelialen Zellen nahegelegt werden, die auch in der CGH einen unauffälligen Karyotyp aufwiesen und aus den Knochenmark von Brustkrebspatienten stammten.

Für die in der folgenden Arbeit geplante spezifische Analyse von Punktmutationen bei disseminierten Tumorzellen wurden drei Gene ausgewählt, deren Mutation entweder ein weitverbreitetes Ereignis darstellt oder deren Mutation so früh in der Tumorigenese auftritt, daß sie trotz der oben beschriebenen Heterogenität in der Mehrzahl aller disseminierten Tumorzellen erwartet werden durfte. Zur ersten Gruppe zählt das Tumorsuppressorgen *TP53*, das in der Hälfte aller menschlichen Tumoren mutiert ist (Harris, 1993), oder *PIK3CA* für das Colonkarzinom, wo Mutationsraten um die 30% angegeben werden (Samuels *et al.*, 2004). Das Paradebeispiel der zweiten Gruppe stellt die Mutation des *KRAS*-Gens dar, das im Falle des Pankreaskarzinoms mit einer Mutationsrate von über 80% bereits in der Mehrzahl der Krebsvorstufen mutiert ist (Yonezawa *et al.*, 2008).

## 1.4 Untersuchte Gene: *TP53*, *KRAS* & *PIK3CA*

### ***TP53* (Tumor Protein 53)**

Das *TP53*-Gen besteht aus 11 Exons und liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17q21-q22). Der vom *TP53*-Gen kodierte Transkriptionsfaktor p53 ist ein Protein aus 393

Aminosäuren, das in der SDS-Gelelektrophorese bei einem Molekulargewicht von 53 kDa läuft. p53 reagiert auf unterschiedliche Arten von zellulärem Streß, indem es Zielgene reguliert, die einen Zellzyklusarrest, Apoptose, DNA-Reparatur, Seneszenz (Stegh, 2012) oder Änderungen im Zellstoffwechsel bewirken (s. Abb. 2) (Biegging *et al.*, 2012). Zusätzlich gibt es Hinweise, daß *TP53* auch einen Einfluß auf die Fertilität hat (Hu, 2009). In normalen Zellen kommt das p53-Protein wegen seiner kurzen Halbwertszeit von ca. 20 min nur in äußerst geringen Mengen vor (Ashcroft *et al.*, 1999), weil es von seinem negativen Regulator mdm2 rasch inaktiviert und degradiert wird. Bei Streßsituationen hingegen wird p53 phosphoryliert und kann deswegen nicht mehr von mdm2 gebunden und ubiquitiniert werden (Shieh *et al.*, 1997). p53 akkumuliert daraufhin in der Zelle und kann Signalwege aktivieren, die über einen G<sub>1</sub>-Arrest zur DNA-Reparatur oder, sollte dies nicht mehr möglich sein, zur Apoptose führen. Darüber hinaus reguliert mdm2 die Expression von p53 und umgekehrt: *MDM2* hemmt die Transkription von p53, p53 bewirkt hingegen eine verstärkte Expression von mdm2 (Lakin, 1999).

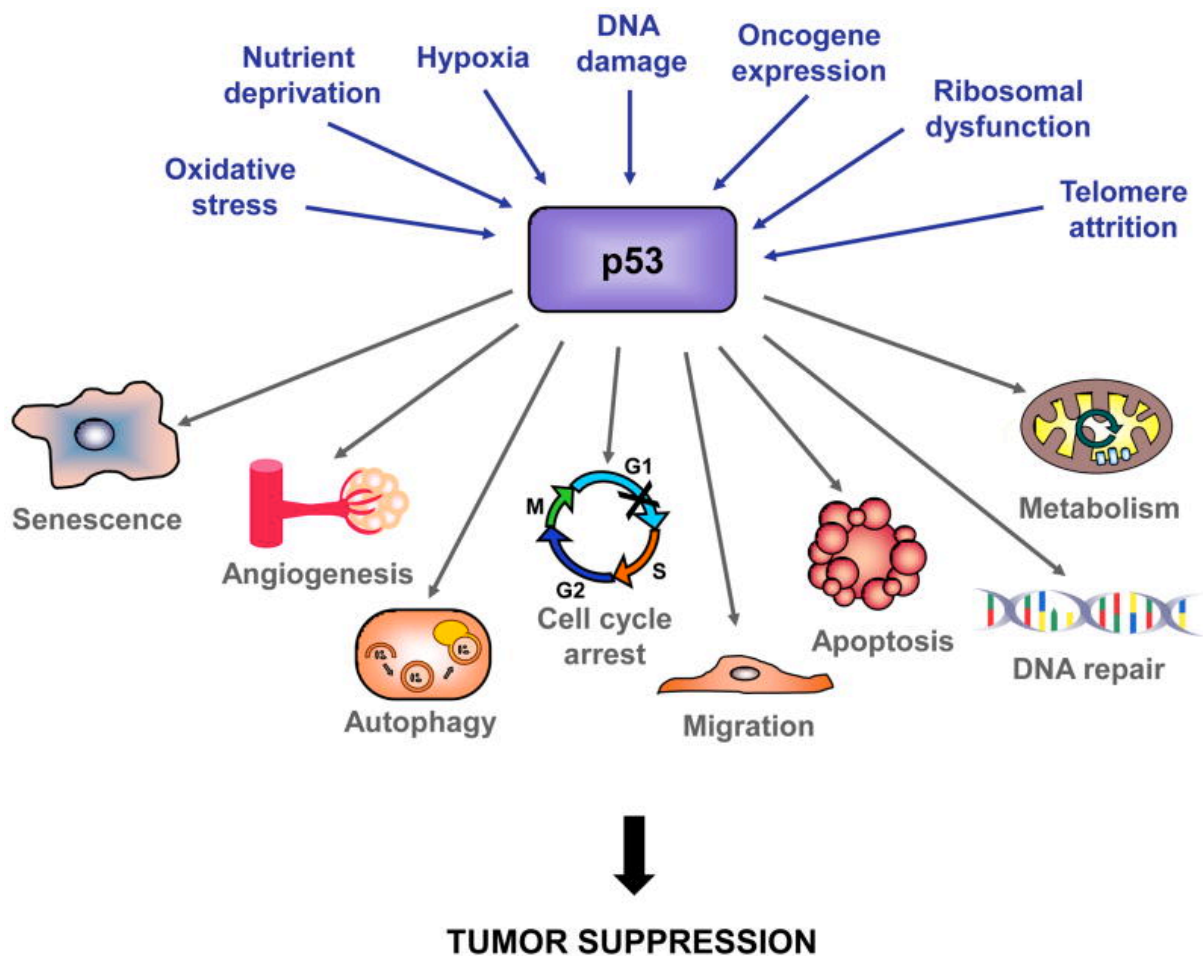
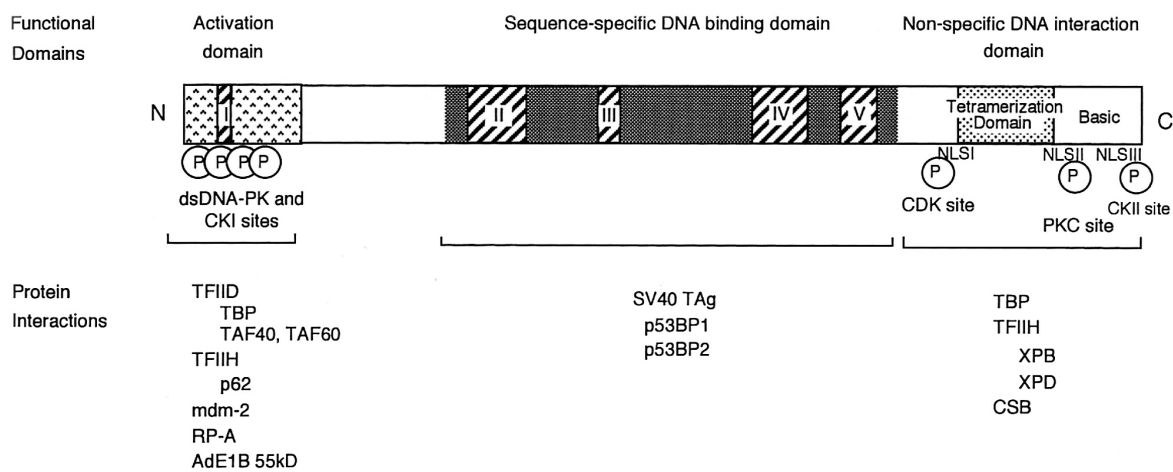


Abb. 2: p53-Aktivierung durch zellulären Streß (aus: Biegging *et al.*, 2012).

Aktivierung von p53 d. DNA-Schädigung, Hypoxie, Onkogene führt zu G<sub>1</sub>-Arrest o. Apoptose.

Auf dem p53-Protein unterscheidet man verschiedene Domänen (s. Abb. 3): Die C-terminale Domäne ist wichtig für die Regulation der Funktionen von p53 und ist in der Lage, unspezifisch an DNA zu binden. Außerdem können durch die dort gelegene Tetramerisierungsdomäne zwischen den Aminosäuren 325-356 zwei symmetrische p53-Dimere gebildet werden, die als Tetramer die Bindung der sequenzspezifischen zentralen DNA-Bindungsdomäne (Aminosäuren 102-292) an einen DNA-Strang deutlich verstärken (McLure *et al.*, 1998). Der N-terminale Bereich zwischen den Aminosäuren 1-42 hat Transaktivierungseigenschaften, d.h. ist in der Lage, die Transkription von Genen zu steuern.



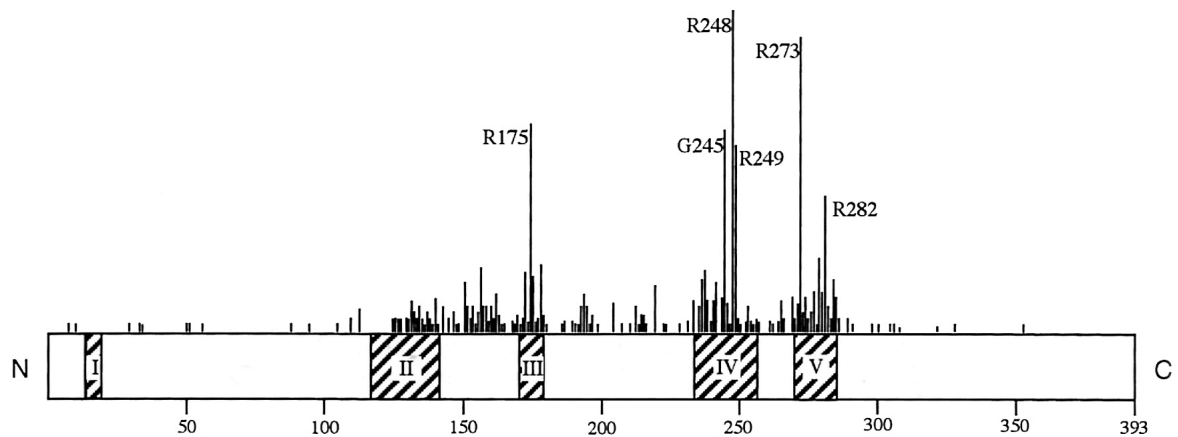
**Abb. 3: Struktur des p53-Proteins (aus: Ko and Prives, 1996)**

Am N-terminalen Ende befindet sich die Transaktivierungsdomäne, am C-terminalen Ende die Tetramerisierungsdomäne, dazwischen die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne. Die schraffierten Felder stellen wiederum die konservierten Regionen dar, zusätzlich Angabe von Kernlokalisierungssequenzen (NLSs) und Phosphorylierungsstellen (Ps).

Das aktivierte p53 kann auf verschiedene Art und Weise in den Zellzyklus eingreifen; so transaktiviert p53 zum Beispiel die Biosynthese des Proteins p21, welches den Cyclin D/CDK4/6-Komplex wie auch den Cyclin E/CDK2-Komplex hemmt. Dadurch wird die Phosphorylierung von Rb und damit die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F unterbunden. Der Zellzyklus wird gestoppt, und die Zellen arretieren in der G<sub>1</sub>-Phase. Zum anderen werden Gene exprimiert, deren Produkte zur Induktion des programmierten Zelltods führen, wie Bax, PIG-3, NOXA, PUMA sowie Fas/APO-1 und KILLER/DR5 (Sherr *et al.*, 2004).

Wie wichtig die Funktion der sequenzspezifischen DNA-Bindung von p53 ist, läßt sich daraus ableiten, daß man in dieser Region 95% der TP53-Mutationen findet (Exons 4-8)

(Greenblatt *et al.*, 1994). Neben der Einteilung nach funktionellen Domänen kann man auf p53-Protein auch eine Einteilung nach stark konservierten Einheiten vornehmen. Diese Domänen, die sich beim Vergleich von p53 in verschiedenen Spezies durch einen starken Homologiegrad auszeichnen, bezeichnet man als Boxen I-V. Gerade in diesen Regionen hat man in p53 in vielen verschiedenen Tumorarten eine Anhäufung von Mutationen („hot spots“) finden können (Abb. 4) (Ko and Prives, 1996), welche in der Folge DNA-Bindung wie auch Dimerisierung / Tetramerisierung unmöglich macht.



**Abb. 4: p53-Protein (aus: Ko and Prives, 1996)**

*TP53-Mutationen: Die schraffierten Felder stellen die konservierten Regionen dar. Die Linien geben die Mutationshäufigkeit der jeweiligen Codons an, welche sich auf die konservierten Regionen II-V konzentriert (hotspots: Codon 175, 245, 248, 249, 273 und R282).*

Etwa 75% der *TP53*-Mutation sind missense-Mutationen (Hollstein *et al.*, 1994; *TP53*-Datenbank der IARC, <http://p53.iarc.fr>) - was eine deutlich höhere Rate im Vergleich zu anderen Tumorsuppressorgenen darstellt - , ungefähr 40% davon liegen innerhalb der oben beschriebenen hot spots. Es werden drei Mechanismen beschrieben, wie eine Mutation von *TP53* die Proteinfunktion beeinträchtigen kann: 1. Verlust der Wildtypfunktion, 2. ein dominant negativer Effekt auf die Wildtypfunktion des verbliebenen Allels und 3. der Hinzugewinn eines onkogenen Potentials (Rivlin *et al.*, 2011). Letzteres drückt sich beispielsweise in der Steigerung der Transkription des Multidrug-resistance-Gen(*MDRI*)-Promotors durch ein mutiertes p53 (Dittmer *et al.*, 1993) oder in der Induktion der VEGF-Expression (Kieser *et al.*, 1994) aus.

Bronchialkarzinome zeigen einen häufigen Verlust der Heterozygotität (LOH) im Bereich von 17p. Die *TP53*-Mutation beinhaltet bevorzugt eine G:C-T:A-Transversion, die in anderen

Organen nur selten beobachtet wird. Unter den Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC), die mit 85% am häufigsten sind, wird eine *TP53*-Mutationsrate von ca. 50 % angegeben (Takahashi *et al.*, 1991; Wistuba *et al.*, 2001), bei den Kleinzelligen Karzinomen von mehr als 90% (Wistuba *et al.*, 2001). Der Zeitpunkt des Auftretens einer *TP53*-Mutation wird übereinstimmend als „früh“ angegeben: Die Mutationen wurden von der überwiegenden Zahl einer Serie von Primärtumoren und dazugehörigen Lymphknotenmetastasen geteilt (Chang *et al.*, 2011), so daß das Auftreten einer *TP53*-Mutation von Chang *et al.* zumindest auf den Zeitpunkt vor der Metastasierung festgelegt wurde.

Die *TP53*-Mutationsrate in Prostatakarzinomen wird noch immer nicht einheitlich in der Literatur angegeben, die Raten schwanken zwischen 3 und 42% (Dong 2006; Gumerlock *et al.*, 1997; Beltran *et al.*, 2012) Dennoch wurden *TP53*-Mutationen auch in 19% von benignen Prostatahyperplasien nachgewiesen, während in dieser Studie eine *TP53*-Mutationsrate von Prostatakarzinomen von 26% beschrieben wurde (Schlechte *et al.*, 1998).

Ein Review von Borresen (2003) gibt eine *TP53*-Mutationsrate von Mammakarzinomen von ca. 30% an, diese Mutationen sind häufig mit einem Verlust des Wildtypallels vergesellschaftet. Betrachtet man das Mammakarzinom auf molekularer Ebene, erfolgt eine Einteilung in östrogenrezeptorpositive Tumoren mit geringer bzw. höherer Aggressivität (Luminal-A bzw. Luminal-B), HER2-positive Tumoren sowie Karzinome ohne Expression von Hormonrezeptoren oder HER2 (triple-negative Tumore bzw. Tumore mit Basalzell-Eigenschaften). Hierbei gibt es starke Unterschiede in der *TP53*-Mutationsrate: Während im Luminal-A-Subtyp eine Mutation sehr selten ist, ist *TP53* in 29% der Luminal-B-Subtypen mutiert. In der Gruppe von HER2-positiven Tumoren wird eine *TP53*-Mutation in 72% beschrieben, Tumore mit Basalzell-Eigenschaften tragen in 80% eine *TP53*-Mutation (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Widersprüchliche Aussagen liegen bezüglich der Detektion von *TP53*-Mutationen bereits in Krebsvorstufen vor; so wurden in hochgradigen duktalem Carcinoma in situ (DCIS) von einer Arbeitsgruppe keine Mutationen beschrieben (Ho *et al.*, 2000), während Done *et al.* (2001) eine Mutationsfrequenz von sogar 40% angeben.

Über das Oesophaguskarzinom existieren nur vergleichsweise wenige Daten bezüglich der *TP53*-Mutationsrate. Ito *et al.* (2005) beschreiben eine große intratumorale genetische Heterogenität der *TP53*-Mutationen (lediglich 11% der *TP53*-Mutationen können in einer Studie in sämtlichen mikrodissezierten Arealen eines Tumors nachgewiesen werden), was die Autoren zum Schluß einer multizentrischen Tumorentstehung kommen läßt. Schneider *et al.* (1996) konnten in 46% der Oesophaguskarzinome eine *TP53*-Alteration finden; lediglich in 3/48 Krebsvorstufen (Barrett-Oesophagus) konnte ebenfalls eine *TP53*-Mutationen nachgewiesen werden. Diese Rate deckt sich mit den Beobachtungen von Madani *et al.*, (2010), die auf eine *TP53*-Mutationsrate von 47% kamen. Der Einfluß von Karzinogenen in Tabakrauch oder Nahrungsmitteln wie führt zu teilweise dramatisch erhöhten Indizidenzen des

Oesophaguskarzinoms in Risikoregionen mit *TP53*-Mutationsraten von bis zu 90% (Abedi-Ardekani *et al.*, 2011; Bellini *et al.*, 2012).

Beim Pankreaskarzinom ist die Datenlage wieder etwas ergiebiger; 50-70% der Pankreaskarzinome weisen *TP53*-Mutationen auf (Scarpa *et al.*, 1993; Yonezawa *et al.*, 2008). Yonezawa *et al.* haben auch Krebsvorstufen (PanIN = Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie) auf eine *TP53*-Mutation hin untersucht, hierbei waren bei den höhergradigen Dysplasien (PanIN 3) immerhin 12% positiv für eine *TP53*-Alteration.

Im genetischen Modell der schrittweisen colorektalen Karzinomentstehung nach Fearon und Vogelstein (1990) wird das Auftreten einer *TP53*-Alteration für den Übergang vom späten Adenom zum Colonkarzinom beschrieben. *TP53* ist in 40–50% der colorektalen Karzinome mutiert (*TP53*-Datenbank der IARC). Da die Mutation häufiger in späten, hochgradig dysplastischen Adenomen vorkommt, wird postuliert, daß sie am Übergang zum Karzinom, aber noch vor der Metastasierung auftritt (Liu *et al.*, 2006).

### ***KRAS* (Kirsten Ratten-Sarkom-Homolog)**

Die drei Mitglieder der *RAS*-Genfamilie sind *NRAS*, welches auf Chromosom 1 liegt, *HRAS* auf Chromosom 11 sowie *KRAS* auf Chromosom 12. Die Wildtyp-ras-Proteine sind GTP/GDP-bindende Proteine, die als Glieder intrazellulärer Signaltransduktionswege firmieren und Wachstums-, Differenzierungs- und Alterungsprozesse regulieren. Jedes der drei Gene kodiert für ein stark homologes Protein von 21 kDa.

Normalerweise liegt ras in seiner inaktiven Form an GDP gebunden an der Innenseite der Zellmembran vor. Bei einem externen Signal wird GDP gegen GTP ausgetauscht. Im Zustand der GTP-Bindung nimmt das ras-Protein seine aktive Form ein und leitet das Signal weiter. Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität wird danach GTP zu GDP hydrolysiert und ras damit wieder inaktiviert. Bei einer Mutation verliert ras seine GTPase-Aktivität, was zu einem permanenten wachstumsstimulierenden Signal führt (Shih *et al.*, 1982; Kranenburg *et al.*, 2005).

Das *KRAS*-Gen kodiert für ein humanes zelluläres Homolog eines transformierenden Gens, welches aus dem Kirsten Ratten-Sarkom-Virus isoliert wurde und besitzt zwei Isoformen, wobei die eine, *KRAS1*, ein Pseudogen ist und die andere, *KRAS2*, für ein 188 Aminosäuren großes Protein kodiert, das sich in lediglich 6 Aminosäuren vom viralen Gen unterscheidet. Ein alternatives Splicing des Exon 5 führt zu den Isoformen *KRAS2A* und *KRAS2B*.

17-25% aller Tumoren beherbergen eine aktivierende *KRAS*-Mutation (Kranenburg *et al.*, 2005), welche nahezu ausschließlich die Codons 12, 13 und 61 betrifft.

Die höchste Frequenz von *KRAS*-Mutationen wird mit 75-100% in Pankreaskarzinomen gefunden (Almoguera et al., 1988; Smit et al., 1988), die meisten davon betreffen das Codon 12 im Exon 2. Bereits Krebsvorstufen (PanIN) haben in einem extrem hohen Prozentsatz an *KRAS*-Mutationen - so weisen bereits ca. 60% der geringgradigen PanINs eine Mutation auf, bei den mittel- und höhergradigen PanINs sind es über 80% (Yonezawa *et al.*, 2008).

*KRAS*-Mutationen treten bei 27-50% der kolorektalen Karzinome auf (Bos 1989; Shaw et al., 1991; Olschwang et al., 1997; Andreyev et al., 2001). Gemäß dem genetischen Modell der kolorektalen Karzinomentstehung nach Fearon und Vogelstein (1990) markieren *KRAS*-Mutation den Übergang vom frühen zum intermediären Adenom, was sich auf die Beobachtung stützt, daß Adenome unter einem Zentimeter Größe in weniger als 10%, größere Adenome aber in bis zu 50% Mutationen im *KRAS*-Gen aufweisen (Vogelstein et al., 1988).

### ***PIK3CA***

*PIK3CA* kodiert die p110 $\alpha$  katalytische Untereinheit der Klasse IA Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K). Phosphoinositid-3-Kinasen sind Heterodimere, die aus einer 85 kDa großen regulatorischen Untereinheit sowie einer 110 kDa großen katalytischen Untereinheit bestehen (Samuels *et al.*, 2005). Die Aktivierung der PI3K erfolgt über Rezeptortyrosinkinasen, wie den EGF-Rezeptor, den PDGF-Rezeptor oder den Insulin-Rezeptor. Hauptfunktion der PI3K ist die Bereitstellung des second messengers Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) (Cantley, 2002). Der Gegenspieler innerhalb dieses Signalwegs ist die Phosphatase und Tensin Homolog PTEN. Aktiviertes PTEN unterbricht durch Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> das PI3K-vermittelte Signal.

Diesen Signalweg betreffende Mutationen sind in vielen Tumoren zu finden: Aktivierende Mutationen der katalytischen Untereinheit der PI3K können zum Überleben und Wachstum von Tumorzellen beitragen. Der Gegenspieler, PTEN, hat in diesem Zusammenhang Funktionen eines Tumorsuppressors; inaktivierende Mutationen führen zum Wegfall dieser proliferationshemmenden Wirkung (Cully *et al.*, 2006).

Das *PIK3CA*-Gen ist in etwa 30% der kolorektalen Karzinome mutiert (Samuels *et al.*, 2004). Die Mehrzahl dieser Mutationen konzentriert sich auf die Codons 542-545 der helikalen Domäne (Exon 9) sowie das Codon 1047 der Kinase-Domäne (Exon 20), so daß sich hier eine fokussierte Untersuchung dieser hot spots - ohne Analyse des gesamten Gens - anbietet (Liao *et al.*, 2012)

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Diese Dissertation stellt die Frage nach der Rolle von Mutationen ausgewählter Gene, deren Rolle in der Tumorigenese ohne Zweifel belegt ist. Der Zeitpunkt, wann die Veränderung dieser Gene in der somatischen Progression erfolgt, ob vor oder nach der Streuung von Tumorzellen, ist von wesentlicher Bedeutung für das Verständnis der humanen Krebserkrankung. Nur eine frühe, den meisten disseminierten Tumorzellen in zumindest einer Tumorentität gemeinsame Mutation könnte darüber hinaus die Hoffnung auf eine möglicherweise therapeutische Zielstruktur beinhalten.

Zu diesem Zweck sollen einzelne disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark oder von Lymphknoten von Karzinompatienten molekular analysiert und mit dem jeweiligen Primärtumor verglichen werden. Für die Gene *TP53* und *KRAS2* sollte mit der SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism - Analyse) eine einfache und kostengünstige Screeningmethode auf der Suche nach Punktmutationen etabliert werden; die betreffenden hotspots des *PIK3CA*-Gens sollten direkt sequenziert werden.

Zunächst aber war es zu Beginn der Arbeit notwendig, die Verlässlichkeit der Methode der Punktmutationsanalyse von disseminierten Tumorzellen an einzelnen, normalen Zellen eines Kontrollkollektivs zu validieren. Hierbei galt es zu klären, ob potentiell zu findende Allelverluste auch wirkliche, tumorbedingte Allelverluste sind oder diese auf methodischen Artefakten beruhen können. Zum anderen mußte sichergestellt werden, daß der Austausch einer einzigen Base tatsächlich eine Punktmutation darstellt und bei der Einzelmolekülanalyse der Ausgangs-DNA keinen Fehler in der PCR darstellt.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus
CCD-Kamera (Agarose-Gel)	Intas
Elektronische Präzisionswaage	Sartorius Laboratory
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech
Fluoreszenzmikroskop Leica DMXA-RF8	Leitz
FluorImager SI	Molecular Dynamics
Horizontal Gel Electrophoresis System	Gibco BRL
Invertmikroskop Leica DBM IRB	Leitz
Kryotom Leica Jung Frigocut 2800 E	Leitz
Medimachine	Dako
Mikromanipulator, Microinjector 5242	Eppendorf
Mikrotom Leica RM 2025	Leitz
Palm-Lasermikroskop	Palm
PCR Gerät Peltier Thermal Cycler PTC 200	MJ
Roller/Mixer SRT 1	Stuart Scientific
Tischzentrifuge	Eppendorf
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermoprinter	Sony
Vertikal-Gelkammer Protean xii	BioRad
Zentrifuge Hettich-Rotixa	Hettich

#### 2.1.2 Enzyme

Expand Long Template Kit	Roche
Mse I	New England Biolabs
OPA plus (OnePhorAll plus Buffer)	Amersham
Proteinase K	GibcoBRL
T4 DNA Ligase	Roche
Taq-Polymerase	Roche
Panscript Taq-Polymerase	PAN Biotech

### 2.1.3 Oligonukleotide

**Tabelle 1: Oligonukleotidsequenzen der verwendeten PCR-Primer**

LIB1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT	
ddMse11	TAA CTG ACA G-didesoxy C	
p53 ex. 4 I 5'	GCT CTT TTC ACC CAT CTA CAG	5'-FITC
p53 ex. 4 I 3'	GAA GGG ACA GAA GAT GAC AG	
p53 ex. 4 III 5'	CTG GTC CTC TGA CTG CTC	
p53 ex. 4 III 3'	GCA GCC TCT GGC ATT CTG	5'-FITC
p53 ex. 4 IV 5'	CGA TAT TGA ACA ATG GTT CAC TG	5'-FITC
p53 ex. 4 IV 3'	GAA GTC TCA TGG AAG CCA	
p53 ex. 5 5'	TCA CTT GTG CCC TGA CTT TCA	5'-FITC
p53 ex. 5 3'	TCT CCA GCC CCA GCT GCT	
p53 ex. 6 5'	TTC CTC ACT GAT TGC TCT TAG	5'-FITC
p53 ex. 6 3'	GAC CCC AGT TGC AAA CCA G	
p53 ex. 7 5'	GCG CAC TGG CCT CAT CTT G	5'-FITC
p53 ex. 7 3'	CAC AGC AGG CCA GTG TGC A	
p53 ex. 8 5'	AGG ACC TGA TTT CCT TAC TGC	5'-FITC
p53 ex. 8 3'	GAA TCT GAG GCA TAA CTG CAC	
p53 ex. 9 5'	GTG CAG TTA TGC CTC AGA TTC	5'-FITC
p53 ex. 9 3'	GAG GTC CCA AGA CTT AGT AC	
ras 5'	GTG ACA TGT TCT AAT ATA GTC AC	5'-FITC
ras 3'	CTC TAT TGT TGG ATC ATA TTC GT	
PI3K HS1 5'	AAG CAA TTT CTA CAC GAG A	
PI3K HS1 3'	GTA AAT TCT GCT TTA TTT ATT CC	
PI3K HS1 5'	TCT AGC TAT TCG ACA GCA TGC	
PI3K HS2 3'	TTG TGT GGA AGA TCC AAT CCA T	

Sämtliche Primer wurden von der Firma Metabion, Matrinsried, synthetisiert.

### 2.1.4 Antikörper und Färbereagenzien

3B10-C9 ( $\alpha$ -EpCAM)

Micromet

A45-B/B3 ( $\alpha$ -pan-Cytokeratin)

Micromet

AB-Serum (10ml)

Biotest

APAAP- Komplex	Dako
Anti-Mouse-Cy3	Dianova
BCIP/NBT (AP Color Reagent)	BioRad
B-Phycoerythrin Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch
CK2 ( $\alpha$ -Cytokeratin 18)	Roche
Eosin	Sigma
Epimet-Kit	Micromet
ELF-97 Kit	Molecular Probes
Mayer's Hämatoxylin	Sigma
MOPC 21 (IgG <sub>1</sub> -Isotypkontrolle)	Sigma
Z259 (Brückenantikörper)	Dako

### 2.1.5 Chemikalien und sonstige Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 30%	BioRad
Agarose GTG Seakem	Biozym
APS	Amersham
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Roche
Chloroform	Sigma
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Pharmacia
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-Ethyl-9-Phenyl-Phenanthridinium Bromid)	Sigma
Ficoll-400	Sigma
Formamid	Merck
Glaskapillaren	
Glycogen	Sigma
Glyzerin	Sigma
Haftobjektträger	Micromet
Isopropanol	Roth
Igepal	Sigma
Kaliumchlorid	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
Magnesiumchlorid	Sigma
Magnesiumsulfat	Merck
Molekulargewichtsstandard	Gibco BRL
MOPS	Sigma
Natriumazetat	Roth
Natriumbicarbonat	Sigma



## 2.1.8 Tumorzelllinien

Tabelle 2: Zelllinien / Patientenproben für die *TP53*-Analyse

ex.	Zelllinie	ATCC-Nr.	Herkunft	cd.	aus	wird	Mutation
<b>4</b>	Patient BN			72	CCC		
	Patient DN			72	CCC / CGC		
	Patient MN			72	CGC		
	UM-UC-3	CRL-1749	Blasenkarzinom	113	TTC	TGC	Punktm.
<b>5</b>	BT-20	HTB-19	Mammakarzinom	132	AAG	CAG	Punktm.
	K-562	CCL-243	CML	136	-	-	Amp. +1
	PC3	CRL-1435	Prostatakarzinom	138	-	-	Delet. -1
	H69AR	CRL-11351	Bronchial-Ca.	171	GAG	TAG	Punktm.
	Panc Tu-1	N. Lemoine	Pankreaskarzinom	176	TGC	AGC	Punktm.
<b>6</b>	T-47D	HTB-133	Mammakarzinom	194	CTT	TTT	Punktm.
	Raji	CCL-86	Burkitt-Lymphom	213	CGA	CAA	Punktm.
	Patient N.			215	AGT	GGT	Punktm.
	DU145	HTB-81	Prostatakarzinom	223	CCT	CTT	Punktm.
<b>7</b>	HT-3	HTB-32	Cervixkarzinom	245	GGC	GTC	Punktm.
	Colo 320	CCL-220.1	Colonkarzinom	248	CGG	TGG	Punktm.
<b>8</b>	SW480	CCL-228	Colonkarzinom	273	CGT	CAT	Punktm.
	A-431	CRL-1555	epidermoides Ca.	273	CGT	CAT	Punktm.
	J 82	HTB-1	Blasenkarzinom	274	GTT	TTT	Punktm.
	DU 145	HTB-81	Prostatakarzinom	274	GTT	TTT	Punktm.
<b>9</b>	SW480	CCL-228	Colonkarzinom	309	CCC	TCC	Punktm.
	J 82	HTB-1	Blasenkarzinom	320	AAG	AAC	Punktm.

Tabelle 3: Zelllinien für die *KRAS2*-Analyse (12p12.1) (Pseudogen 6p12-p11)

ex.	Zelllinie	ATCC-Nr.	Herkunft	cd.	aus	wird	Mutation
<b>1</b>	Panc Tu-1	N. Lemoine	Pankreaskarzinom	12	GGT	GTT	homozyg
	SW480	CCL-228	Colonkarzinom	12	GGT	GTT	heterozyg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Zelllinien bis auf Panc Tu-1 (aus dem Labor von N. Lemoine) werden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Standard-Nährmedium ist RPMI 1640, dem 2 mM L-Glutamin, 1,5 g/l Natriumbicarbonat, 4,5 g/l Glucose, 10 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat sowie 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wird. Abweichend hiervon kommt Eagle's Minimal Essential Medium für die Zelllinien UM-UC-3, BT20, DU 145, J82, K-562 und A-431 zum Einsatz.

### 2.2.2 DNA-Isolierung

Für die Extraktion größerer Mengen DNA, wie z.B. aus Zellkulturzellen oder Leukozyten aus dem peripheren Blut (PBL) von gesunden Spendern wird die Aussalzmethode (modifiziert nach Miller et al. 1988) verwendet:

Die Zellen ( $0,3 - 6 \times 10^6$  Zellen) werden nach Waschen in PBS zunächst in Lösung A resuspendiert, anschließend erfolgt durch Zugabe von Lösung B die Lyse bei 37°C über Nacht. Zur Entfernung von Zellbestandteilen und Kernproteinen wird ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 zugegeben und kräftig gemischt. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 20.000 g für 5 min. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und verbliebene Proteinreste durch Zugabe eines gleichen Volumens Chloroform nach erneutem kräftigen Mischen sowie Zentrifugation bei 20.000 g für 5 min entfernt.

Die wässrige Phase wird dann wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 µl Glycogen, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,5 sowie 1 Volumen Isopropanol 100% über Nacht bei -20°C gefällt. Nach einem Waschschriff mit Ethanol 70% wird die DNA leicht trocknen gelassen und anschließend in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Lösung A: 100 mM KCl  
10 mM Tris/HCl pH 8,3  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

Lösung B: 10 mM Tris/HCl pH 8,3  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1% Tween  
1% NP40  
120 µg/ml Proteinase K

### 2.2.3 Knochenmarkaufarbeitung

Das Knochenmark wird zunächst mit Hank's Salzlösung auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 170g zentrifugiert, um grobe Verunreinigungen wie z.B. Fett sowie Thrombozyten zu entfernen. Der Überstand wird verworfen, das Pellet auf 7 ml mit PBS aufgefüllt und resuspendiert. Diese Zellsuspension wird vorsichtig auf 7 ml Percoll 50 überschichtet und 10

min bei 1000g zentrifugiert. Die aus mononukleären Zellen bestehende Interphase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit PBS aufgefüllt und 10 min bei 500g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet im ca 1ml PBS resuspendiert und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je 500.000 Zellen werden auf ein Areal eines Haft-Objektträgers aufgetragen wo sie ca. 1h sedimentieren.

Einzelzellsuspensionen, die aus Lymphknotengewebe mit Nährmedium (RPMI1640) in der DAKO Medimachine hergestellt werden, werden nach dem gleichen Protokoll aufgearbeitet.

#### **2.2.4 Immunzytologische Detektion epithelialer Zellen in Knochenmark und Lymphknoten**

Sowohl Knochenmarkpräparate wie auch mit der Medimachine erzeugte Einzelzellsuspensionen aus Lymphknotenpräparaten werden mit einem Antikörper gegen einen epithelialen Marker in einer feuchten Kammer gefärbt. Unspezifische Bindungsstellen werden 20 min mit 10%igem humanen AB-Serum blockiert, und nach jeder Antikörperbindung erfolgen mehrere Waschschrte mit PBS. Bei jeder Färbung wird als Positivkontrolle ein Präparat der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mitgeführt. Als Negativkontrolle dient ein Patientenpräparat, bei dem ein Antikörper gleichen Isotyps (IgG<sub>1</sub>) als Primärantikörper verwendet wird.

Der Unterschied zwischen einzelnen Probenarten liegt im Antikörper für die Detektion der epithelialen Zellen. In den meisten Knochenmarkproben wie auch Lymphknoten-einzelzellsuspensionen erfolgt der Nachweis über das intrazelluläre Zytoskelett durch Cytokeratin-Färbung, wahlweise mit einem Antikörper gegen Cytokeratin 18 oder mit einem pan-Cytokeratin-Antikörper, der ein gemeinsames Epitop der Cytokeratine 8, 18 und 19 bindet.

In Lymphknoteneinzelzellsuspensionen und Knochenmarkproben von Bronchialkarzinompatienten wird das extrazelluläre epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (17-1A-Antigen) nachgewiesen. Ebenso werden einige Knochenmarkproben von Prostatakarzinompatienten mittels  $\alpha$ -EpCAM-Färbung untersucht, andere mit einem pan-Cytokeratin-Antikörper gefärbt und ein Teil einer  $\alpha$ -Cytokeratin-EpCAM-Doppelfärbung unterzogen.

#### **A45-APAAP / CK2-APAAP**

Nach 20-minütiger Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 10%igem humanen AB-Serum werden pro Auftragsfläche 250  $\mu$ l Primärantikörperverdünnung 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Folgende Antikörper werden dabei in den jeweiligen Verdünnungen (jeweils in 5% AB-Serum) verwendet:

A45-B/B3 ( $\alpha$ -pan-Cytokeratin)	2,5 $\mu$ g/ml	(Micromet, Martinsried)
CK2 ( $\alpha$ -Cytokeratin 18)	2,5 $\mu$ g/ml	(Roche, Mannheim)
MOPC 21 (IgG <sub>1</sub> -Isotypkontrolle)	2 $\mu$ g/ml	(Sigma, Deisenhofen)

Mit Hilfe des Brückenantikörpers Z259 (30 min 160  $\mu$ g/ml) wird der APAAP- Komplex (30 min 1,5  $\mu$ g/ml) an die Primärantikörper gekoppelt und 10 min mit BCIP/NBT enzymatisch entwickelt. Am Ende wird 5 min mit 1% PFA fixiert.

### **A45 F<sub>ab</sub>-Kit**

Der Epimet-Kit, bei dem ein A45 F<sub>ab</sub>-Fragment bereits direkt mit der alkalischen Phosphatase konjugiert ist und lediglich enzymatisch entwickelt werden muß, erlaubt zum einen ein noch schnelleres Arbeiten. Andererseits ergibt sich hierbei auch die Möglichkeit einer Doppelfärbung mit einem weiteren Maus-Antikörper (z.B. unten erwähnter 3B10-C9-Antikörper): Bei Verfahren nach der APAAP-Methode würde der Brückenantikörper an die beiden murinen Primärantikörper binden und damit eine Unterscheidung der Antikörperbindung verhindern.

### **3B10-C9**

Analog zum A45-/CK2-Protokoll wird zum Nachweis von EpCAM der Antikörper 3B10-C9 in einer Konzentration von 2,5  $\mu$ g/ml für 10 min inkubiert. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgt mittels B-Phycoerythrin-konjugiertem F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L).

### **Cytokeratin-EpCAM-Doppelfärbung**

Nach 20-minütiger Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 10%igem humanen AB-Serum wird zunächst für 30 min mit dem Panzytokeratin-Antikörper A45- B/B3 (2  $\mu$ g/ml) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird ein mit dem Fluorochrom Cy3 verbundener Sekundärantikörper (4,4  $\mu$ g/ml) gegen murines IgG an den Primärantikörper A45 gekoppelt. Zur Färbung des gleichen Präparats gegen EpCAM wird zunächst mit 5% Mausserum in PBS blockiert (20 min), bevor die Präparate mit einem murinen biotinylierten 3B10-Antikörper gegen humanes EpCAM inkubiert werden (30 min). Nach dreimaligem Waschen in TBS folgt die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex für 30 min. Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBS werden die Präparate 10 min in ELF-Waschlösung gehalten. ELF (enzyme labelled fluorescence) ist ein bläulicher Fluoreszenzfarbstoff, der nach dem Umsetzen mit alkalischer Phosphatase gelbgrün leuchtet. Der ELF-Substratentwicklung für 1 min folgt das Waschen in ELF-Stopplösung (10 min).



### 2.2.5 Isolation der detektierten Zellen

Cytokeratin- oder EpCAM-positive Zellen werden mit einem Mikromanipulator von einem Haftobjektträger isoliert. Dazu wird der Haftobjektträger unter einem Invertmikroskop eingespannt und mit PBS 0,5% Tween überschichtet. Unter mikroskopischer Beobachtung kann man die Cytokeratin-positiven Zellen mit einer feinen Glaskapillare mit einem Spitzendurchmesser von etwa 15  $\mu\text{m}$  von dem Haftobjektträger lösen und in ein Areal PBS 0,5% Tween transferieren. In einem 200  $\mu\text{l}$  Reaktionsgefäß wird 2  $\mu\text{l}$  Proteinase K Mix vorgelegt (0,2  $\mu\text{l}$  OPA, 0,13  $\mu\text{l}$  Tween 10%, 0,13  $\mu\text{l}$  Igepal 10%, 0,26  $\mu\text{l}$  Proteinase K 10 mg/ml, 1,28  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O). Anschließend überführt man die Zelle mit einer P2 Pipette (Gilson) in das 200  $\mu\text{l}$  Reaktionsgefäß. Das zelluläre Protein wird in dem Proteinase K Mix 10 h bei 42°C in einer PCR-Maschine verdaut. Danach erfolgt die Inaktivierung der Proteinase K bei 80°C für 10 min.



**Abb. 5: Cytokeratin-positive Zelle im Knochenmark vor zur Isolation verwendeter Mikromanipulatorkapillare**

*Neben ungefärbten Normalzellen ist in der Mitte des Bildes eine über das APAAP-System mit dem Antikörper A45-B/B3 angefärbte Zytokeratin-positive Zelle zu sehen.*

### 2.2.6 Lasermikrodissektion

Mit Hilfe eines Mikrotoms bzw. Kryotoms werden 5  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte von Paraffin-eingebetteten oder kryokonservierten Tumor- und Lymphknotenproben angefertigt. Diese werden auf mit einer Polyethylen-Membran (1,35  $\mu\text{m}$ ) bespannten Objektträgern aufgebracht. Die Paraffinschnitte werden 30 min mit 100% Xylol deparaffinisiert. Die Kernfärbung erfolgt nach einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 85% und 70%) mit 0,1% Hämatoxylinlösung (Mayer's) für 3 min und anschließender Bläuung in Leitungswasser für 30 min.

Referenzschnitte für die genauere histomorphologische Beurteilung werden zusätzlich mit 0,1% Eosin gefärbt, die aufgrund der negativen Wechselwirkung mit der nachfolgenden Einzelzell-PCR bei den Folienschnitten in der Regel vermieden wird. Die Schnitte werden durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und über Nacht bei 42°C getrocknet. Die Tumoreale der Proben werden anhand der Referenzschnitte aufgesucht und die entsprechenden Bereiche der Folienschnitte unter Verwendung eines PALM-Laser-Microbeam-Systems dissektiert. Die herausgelaserten Tumorgewebe-Folienstückchen werden mit einem Laserpuls in einen im Deckel eines PCR-Gefäßes befindlichen Tropfen PCR-Öl katapultiert, der dann durch Zentrifugation in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt werden kann. Nach Proteinase-K-Verdau analog zum Vorgehen in Abschnitt 2.2.5 erfolgt die Amplifikation der genomischen DNA identisch zur Einzelzell-DNA-Amplifikation wie im folgenden Abschnitt beschrieben.

### 2.2.7 Mse-I-PCR

Die Fragmentierung des Genoms erfolgt durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym Mse I (Schnittstelle: T<sup>v</sup>TAA) bei 37°C für 3 h in einer MJ-Research PCR-Maschine (Peltier Thermal Cycler PTC-200). Zu der Proteinase K verdauten Zelle in dem 200 µl Reaktionsgefäß werden 0,2 µl OPA, 0,5 µl Mse I 20 U/µl, 1,3 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Nach der Reaktion wird Mse I bei 65°C in 5 min inaktiviert.

An die durch Mse I generierten 5' TA-Überhänge wird ein Adapter ligiert bestehend aus zwei Oligonukleotiden LIB1 und ddMse11 (HPLC gereinigt, Metabion). Die Basenpaarung des Adapters vor der Ligation wird durch langsames Abkühlen erreicht. Dazu wird 0,5 µl LIB1 100 µM und 0,5 µl ddMse11 100 µM mit 0,5 µl OPA und 1,5 µl H<sub>2</sub>O gemischt und in einem programmierten Gradienten (65°C bis 15°C für je 1 min pro Temperaturschritt) in der PCR-Maschine vorgeformt. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 15°C durch Zugabe des Adapters sowie 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U) und 1 µl ATP 10 mM in das 200 µl Reaktionsgefäß der Mse-I-fragmentierten Zelle.

Die fragmentierte und an den Adapter ligierte DNA der Zelle wird mit einem PCR-Mix aufgefüllt (3 µl Expand-Long-Template-Buffer<sup>®</sup> mit 17.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl dNTP's 10 mM, 1 µl Expand-Long-Template PolMix, 35 µl H<sub>2</sub>O). Der erste Schritt des PCR-Programmes ist, abweichend zu gewöhnlichen Protokollen, ein 68°C Schritt für 3 min. In dieser Zeit findet eine Auffüllreaktion der 3' rezessiven Enden der Genomfragment-Adapter Konstrukte statt, so daß in Folge dessen eine komplementäre LIB1-Primerbindungsstelle entsteht. Das weitere PCR-Programm im MJ-Research ist: 15 Zyklen (94°C 40 sec, 57°C 30 sec, 68°C 1 min 30 sec plus 1 sec/Zyklus), 8 Zyklen (94°C 40 sec, 57°C 30 sec plus 1°C/Zyklus, 68°C 1 min 45 sec plus 1 sec/Zyklus), 22 Zyklen (94°C 40 sec, 65°C 30 sec, 68°C 1 min 53 sec plus 1 sec/Zyklus) und abschließend 68°C für 3 min 40 sec. Das Amplifikat wird als primäres PCR-Produkt einer Zelle bezeichnet und bei -20°C gelagert. Es dient als Template für alle weiteren genomischen Untersuchungen der Einzelzellen und kann bei Bedarf reamplifiziert werden.

### 2.2.8 Reamplifikation

Der Reamplifikations-Ansatz besteht aus 5 µl Expand-Long-Template-Buffer ① mit 17,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl LIB 1 10 µM, 1,75 µl dNTP's 10 mM, 1,25 µl BSA, 0,5 µl Taq-Polymerase (Roche), 36,5 µl H<sub>2</sub>O; hinzugegeben wird 0,5 µl des primären PCR-Produkts.

Die PCR Programmschritte im MJ-Research sind 94°C 2 min, 65°C 30 sec, 72°C 2 min, 14 Zyklen (94°C 40 sec, 65°C 30 sec, 72°C 1 min 30 sec), 10 Zyklen (94°C 40 sec, 65°C 30 sec, 72°C 2 min) und 72°C 3 min.

### 2.2.9 Spezifische PCR

Der PCR Ansatz besteht aus 1 µl PCR-Puffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris pH = 8,5, 500 mM KCl, dNTP's 1 mM), 0,5 µl Primer 1, 0,5 µl Primer 2, 0,25 µl BSA, 0,1 µl Taq-Polymerase (PAN), 7,25 µl H<sub>2</sub>O; hinzugegeben wird 1 µl des Reamplifikats (zu den PCR-Primern: s. Tab. 1).

Die PCR Programmschritte im MJ-Research sind 94°C 2 min, 58°C 30 sec, 72°C 2 min, 15 Zyklen (94°C 15 sec, 58°C 30 sec, 72°C 20 sec), 25 Zyklen (94°C 15 sec, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec) und 72°C 2 min.

### 2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR Produkte werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Standard Gelkonzentration beträgt 1,5% Agarose in TBE. Die PCR-Proben werden mit 1 µl Ethidiumbromid und 2 µl Orange G gemischt, in das Gel geladen und anschließend bei 160 V, 400 mA über 45 min laufen gelassen. Auf einem UV-Schirm mit CCD Kamera wird das Gel digitalisiert und ein Ausdruck auf einem Thermodrucker erstellt.

### 2.2.11 SSCP

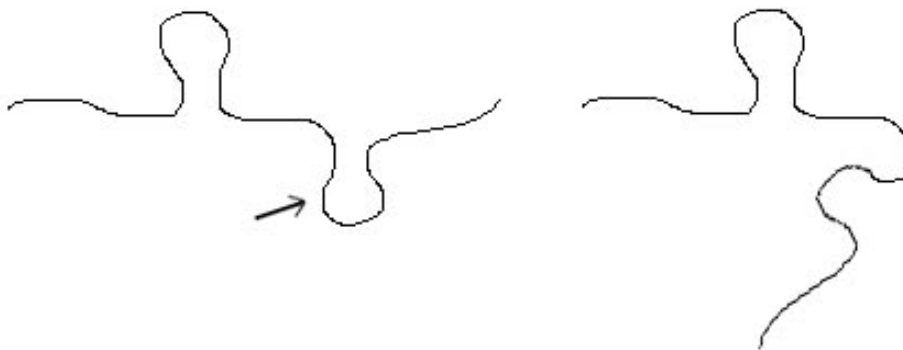
Unter SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism Analysis) versteht man ein Nachweisverfahren von Punktmutationen oder kleineren Deletionen sowie Insertionen aufgrund von Laufunterschieden der DNA-Einzelstränge in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel: Normalerweise besteht die DNA aus einer Doppelhelix, die konstante physikochemische Eigenschaften aufweist, so zum Beispiel auch in der Wanderung im elektrischen Feld. Werden die beiden Stränge jedoch voneinander getrennt, so können die Einzelstränge verschiedene Sekundärstrukturen aufgrund intramolekularer Basenpaarungen annehmen, so daß sich aufgrund einer einzigen Punktmutation die räumliche Struktur eines Stranges derart verändern kann, daß sich ein unterschiedliches Laufverhalten in der Elektrophorese ergibt - die Auftrennung erfolgt also im Unterschied zu denaturierenden Gelen nicht nach der Größe bzw. Ladung der Stränge, sondern nur nach ihrer dreidimensionalen Konformation. Der Vorteil der Methode liegt im kostengünstigen und einfachen Entdecken unbekannter Mutation, die somit z.B. für eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Nachweis nicht zugänglich sind.

3 µl einer PCR-Probe wird mit 6 µl Loadingbuffer (95% Formamid, 20 µM NaOH, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylenxyalol) gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis gegeben und anschließend auf ein Polyacrylamid-Gel geladen (Vertikal-Gelkammer Protean xii). Zur Steigerung der Sensitivität wird die Probe jeweils parallel auf ein Gel mit und ohne 5% Glycerin geladen. Der Lauf erfolgt unter Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur von 4°C, zunächst 5 min bei 400 W, anschließend bei 300 W über 8 - 16 h: p53 exons 4, 6, 7 und ras 8 h, p53 exon 5 12 h sowie p53 exons 8 und 9 16 h. Die Banden werden durch Scannen mit dem FluorImager S visualisiert, wobei die Fluorescein-Markierung der PCR-Primer auch ein anschließendes Weiterlaufenlassen der Gele bei noch zu geringerer Auftrennung der Banden erlaubt.

Ansatz für zwei Gele (15% Polyacrylamid / 1,5 x TBE):

7,5 ml TBE 10 x	7,5 ml TBE 10 x
25 ml PAA 29:1	25 ml PAA 29:1
17,5 ml Aqua bidest	15 ml Aqua bidest
	2,5 ml Glyzerin

Die Polymerisation wird durch die Hinzugabe von 200 µl APS 10% sowie 80 µl TEMED gestartet.



**Abb. 6: Schema des unterschiedlichen Laufverhaltens einzelsträngiger DNA infolge Ausbildung von Sekundärstrukturen im nicht-denaturierenden Acrylamidgel**

*Der linke DNA-Strang weist infolge einer unterschiedlichen Faltung an der mit einem Pfeil markierten Position im SSCP-Gel ein anderes, hier mutmaßlich langsames Laufverhalten als der linke DNA-Strang auf.*

### 2.2.12 Sequenzieren

Die Sequenzierung der PCR-Fragmente erfolgt nach Aufreinigung mittels QIAquick PCR Purification Kit durch die Firma Sequiserve, Vaterstetten, auf einem ABI Prism 3730 Kapillarsequenziergerät. Üblicherweise wird der 5'-PCR-Primer als Sequenzierprimer

verwendet; sollte der Primer-peak, der die ersten 15-20 bp im Anschluß an die Primer-Bindungsstelle überstrahlt, zu nah an der Zielsequenz liegen, wird auf den 3'-Primer ausgewichen.

### 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Primärtumoren, aus dem Knochenmark sowie aus makroskopisch unauffälligen Lymphknoten isolierte disseminierte Tumorzellen derselben Patienten von insgesamt sechs verschiedenen Tumorentitäten untersucht.

Es wurden insgesamt 354 disseminierte Tumorzellen von 127 Patienten sowie 19 cytokeratin-negative Zellen („Normalzellen“) von 9 Patienten, die das gesamte Färbe-/ Isolations- sowie Mse-I-PCR-Verfahren wie die disseminierten Tumorzellen durchlaufen haben, analysiert.

Von insgesamt 95 Patienten konnten mehrere cytokeratin-positive Zellen gewonnen werden, bei 9 Patienten wurden sowohl cytokeratin-positive als auch cytokeratin-negative Zellen isoliert.

Bei jeweils

15 Bronchialkarzinomen (alle M0)	(44 EZ)
12 Prostatakarzinomen (5 x M0, 5 x M0 / biochem. Rezidiv, 2 x M1)	(27 EZ)
17 Mammakarzinomen (12 x M0, 5 x M1)	(66 EZ)
2 Oesophaguskarzinomen (2 x M0)	(6 EZ)
11 Pankreaskarzinomen (11 x M0) und	(29 EZ)
16 Colonkarzinomen (11 x M0, 4 x M1, 1 x Mx)	(41 EZ)
<hr/>	
73 Patienten	(213 EZ)

standen Primärtumoren und Einzelzellen (insgesamt 213 Einzelzellen) des gleichen Patienten zur Verfügung (in Klammern ist jeweils das Metastasierungsstadium mit M0 [keine Fernmetastasen], M1 [Fernmetastasen], Mx [nicht bekannt] angegeben).

#### 3.1 Sensitivität

Bei der globalen Amplifikation des Genoms einer einzelnen Zelle mit einem DNA-Gehalt von nur ca. 6 pg (Morton, 1991) nach der oben beschriebenen Methode konnte gezeigt werden, daß in der CGH keine Artefakte wie Genamplifikationen oder -deletionen auftraten (Klein, Schmidt-Kittler, 1999). Da aber die CGH eine Auflösungsgrenze von 10-20 Megabasenpaaren (Mb) hat, muß zunächst geklärt werden, ob die Methode auch im Sinne der Fragestellung zur Punktmutationssuche auf Genebene eine ausreichende Empfindlichkeit besitzt. Hierbei stellen sich folgende Fragen:

1. Zeigt sich auch auf Einzelzellebene der bereits von Stoecklein (2002) in mikrodisszierten Arealen aus paraffinfixiertem Gewebe nachgewiesene zunehmende Signalverlust mit zunehmender Mse-I- Fragment-Größe?

2. Sind die nach globaler und genspezifischer Amplifikation detektierten Allelverluste auch wirkliche, tumorbedingte Allelverluste oder beruhen diese auf methodischen Artefakten?

Auf den letzten Punkt wurde bereits von Julian Schardt im Rahmen seiner Disserationsarbeit eingegangen, wo eine durchschnittliche Häufigkeit eines artifiziellen Allelverlusts von 16% gefunden wurde.

### 3.1.1 Signalverlust der Einzellzell-PCR

Zur Bestimmung der Sensitivität der PCR wurden zunächst die Ergebnisse der Mse-I-PCR sowie der spezifischen PCRs der Normalzellen betrachtet.

Für diese Arbeit wurden Mse-I-Fragmente von 192 bp bis 1374 bp mit Hilfe folgender PCR-Primer analysiert:

**Tabelle 4: Mse-I-Fragmentgrößen mit zugehörigen PCR-Primern**

Mse-I-Fragment	Mse-I-Fragmentlänge	PCR-Primer	PCR-Fragmentlänge
p53 ex 2-4	1374 bp	p53 ex. 4 I	337 bp
		p53 ex. 4 III	148 bp
		p53 ex. 4 IV	269 bp
p53 ex 5-6	1032 bp	p53 ex. 5	252 bp
		p53 ex. 6	159 bp
p53 ex 7	722 bp	p53 ex. 7	188 bp
p53 ex 8-9	558 bp	p53 ex. 8	248 bp
		p53 ex. 9	147 bp
ras ex 1	192 bp	ras	168 bp

Hierbei zeigt sich ein mit der Mse-I-Fragmentgröße zunehmender Signalverlust: Bei dem 558-bp-Mse-I-Fragment erbrachten die PCR-Reaktionen mit auf dem Fragment gelegenen Primerpaaren für 19/19 Normalzellen ein Signal, wohingegen beim Mse-I-Fragment von 1032 bp nur noch 18/19 PCR-Produkte (5,3% Verlust), bei den Mse-I-Fragmenten von 722 sowie 1374 bp nur noch 17/19 PCR-Produkte nachgewiesen werden konnten (10,5% Verlust).

Dies wird in Tabelle 5 detailliert ausgeführt: Die Häufigkeiten eines positiven PCR-Signals sowie eines Signalverlusts in der *TP53*-PCR von Normalzellen werden numerisch dargestellt. Zusätzlich ist die Tumorentität des Normalzellspenders (MaCa = Mammakarzinom, BC = Brochialkarzinom) sowie das Herkunftsorgan der Einzelzellen (KM = Knochenmark, LK = Lymphknoteneinzelzellsuspension) angegeben.

**Tabelle 5: Prozentuale Signalverluste in Normalzellen in Abhängigkeit von Mse-I-Fragmentgröße und Detektionsmethode**

PCR-Fragment	exon 4	%	exon 5	%	exon 6	%	ges.-%	exon 7	%	exon 8	%	exon 9	%	ges.-%	Σ
Mse-I-Fragment-Größe	1374 bp		1032 bp				722 bp		558 bp						
MaCa KM PCR positiv	4		5		5			5		6		6			6
MaCa KM PCR negativ	2		1		1			1		0		0			
BC KM PCR positiv	3		3		3			2		3		3			3
BC KM PCR negativ	0		0		0			1		0		0			
BC LK PCR positiv	10		10		10			10		10		10			10
BC LK PCR negativ	0		0		0			0		0		0			
Σ gesamt	17/2	10,5	18/1	5,3	18/1	5,3	5,3	17/2	10,5	19/0	0	19/0	0	0	19

Gegenüber diesen eindeutig methodisch bedingten Signalverlusten zeigt sich ein deutlicherer Signalverlust, wenn man die disseminierten Tumorzellen betrachtet: Beim kleinsten Mse-I-Fragment mit 192 bp Größe konnten noch 67 von 76 zu erwartenden PCR-Signalen detektiert werden (9,9% Verlust), beim größten Mse-I-Fragment von 1374 bp betrug der Signalverlust bei nur 170 positiven von 262 möglichen PCR-Produkten bereits 26% (s. Abbildung 7).

Tabelle 6 stellt dies erneut nach Tumorentität (BC = Bronchialkarzinom, PC = Prostatakarzinom, MaCa = Mammakarzinom, OeCa = Oesophaguskarzinom, Panc = Pankreaskarzinom und Colon = Colonkarzinom), Herkunftsorgan der Einzelzellen (KM = Knochenmark, LK = Lymphknoten-einzelsuspension) sowie aufgeschlüsselt nach Detektionsmethode (EpCAM- und Cytokeratin-Einzelfärbung; Cytokeratin-EpCAM-Doppelfärbung) dar.

Hierbei ist wahrscheinlich auch ein Signalverlust durch Gen- oder Allelverluste zu verzeichnen; es ergeben sich aber auch Hinweise auf potentielle weitere methodische Limitationen: So zeigen die aus unter Einsatz der Medimachine aus Lymphknotenpräparaten hergestellten Einzelzellsuspensionen gewonnenen Tumorzellen eine etwas höhere Signalverlustrate als die direkt aus dem Knochenmark isolierten Tumorzellen (16,7 vs 4,7% Signalverlust für das 192-bp-Mse-I-Fragment; 15,2 vs 8,9% für das 558-bp-Mse-I-Fragment; 28,6 vs 21,8% für das 722-bp-Mse-I-Fragment; 17,6 vs 19,8% für das 1032-bp-Mse-I-Fragment sowie 35,7 vs 24,2% für das 1374-bp-Mse-I-Fragment) (s. Tab. 6).



**Tabelle 6: Prozentuale Signalverluste in Tumorzellen in Abhängigkeit von Mse-I-Fragmentgröße und Detektionsmethode**

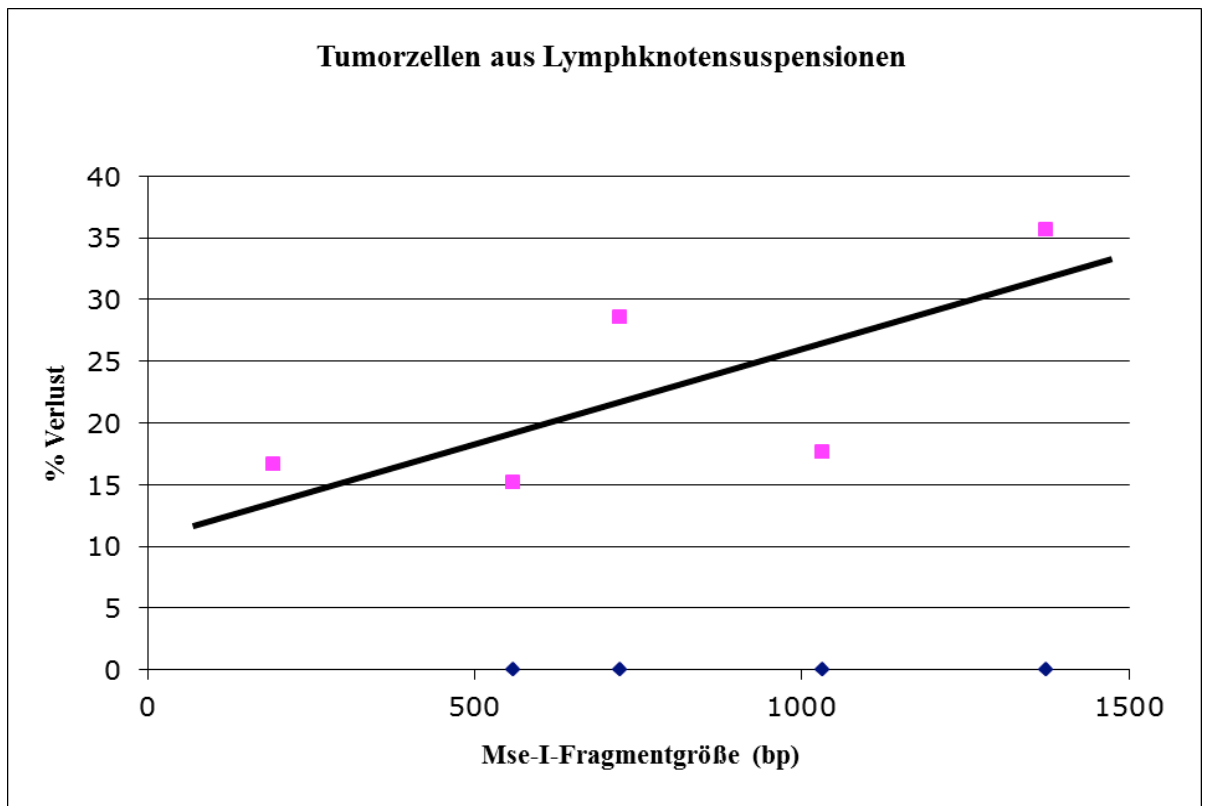
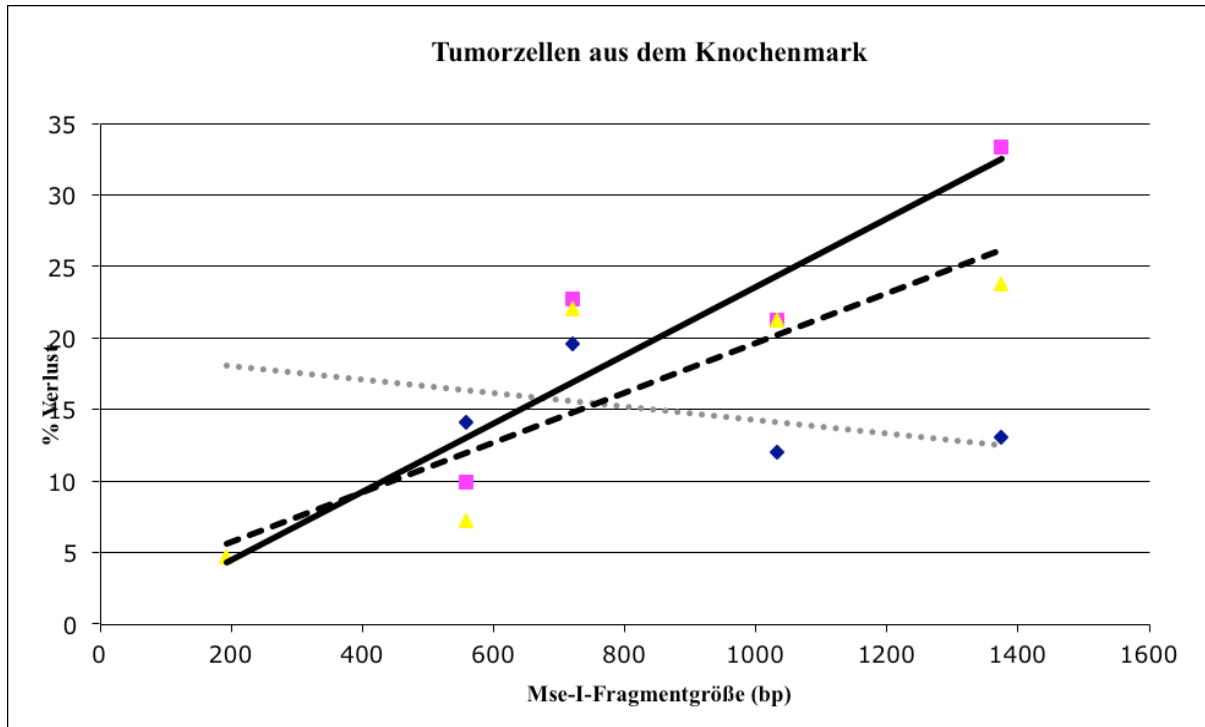
PCR-Fragment	exon 4 %	exon 5 %	exon 6 %	ges.-%	exon 7 %	exon 8 %	exon 9 %	ges.-%	ras %	Σ	Detektion
Mse-I-Fragment-Größe	1374 bp		1032 bp		722 bp		558 bp		192 bp		
BC-KM PCR positiv	40	41	40		37	41	38		entfällt	46	EpCAM
BC-KM PCR negativ	6	5	6		9	5	8		entfällt		EpCAM
PC-KM PCR positiv	44	50	54		51	61	58		entfällt	66	EpCAM/CK
PC-KM PCR negativ	22	16	12		15	5	8		entfällt		EpCAM/CK
MaCa-KM PCR positiv	91	98	94		88	104	110		entfällt	118	CK
MaCa-KM PCR negativ	27	20	24		30	14	8		entfällt		CK
OeCa-KM PCR positiv	19	20	21		22	23	23		entfällt	25	CK
OeCa-KM PCR negativ	6	5	4		3	2	2		entfällt		CK
Panc-KM PCR positiv	19	18	19		20	21	21		21	21	CK
Panc-KM PCR negativ	2	3	2		1	0	0		0		CK
Colon-KM PCR positiv	13	11	12		15	22	21		20	22	CK
Colon-KM PCR negativ	9	11	10		7	0	1		2		CK
Σ KM EpCAM	40/6 <b>13</b>	41/5 10,9	40/6 13 <b>12</b>		37/9 <b>19,6</b>	41/5 10,9	38/8 17,4 <b>14,1</b>			46	
Σ KM EpCAM & EpCAM/CK	84/28 <b>25</b>	91/21 18,8	94/18 16 <b>17,4</b>		88/24 <b>21,4</b>	102/10 8,9	96/16 14,3 <b>11,6</b>			112	
Σ KM CK & EpCAM/CK	186/66 <b>26,2</b>	197/55 21,8	200/52 20,7 <b>21,2</b>		196/56 <b>22,2</b>	231/21 8,3	233/19 7,5 <b>7,9</b>			252	
Σ KM CK	142/44 <b>23,7</b>	147/39 21	146/40 21,5 <b>21,2</b>		145/41 <b>22</b>	170/16 8,6	175/11 5,9 <b>7,3</b>		41/2 <b>4,7</b>	186	
Σ KM gesamt	226/72 <b>24,2</b>	238/60 20,1	240/58 19,5 <b>19,8</b>		233/65 <b>21,8</b>	272/26 8,7	271/27 9,1 <b>8,9</b>		41/2 <b>4,7</b>	298	
BC-LK PCR positiv	9	9	9		9	9	9		entfällt	9	EpCAM
BC-LK PCR negativ	0	0	0		0	0	0		entfällt		EpCAM
OeCa-LK PCR positiv	2	3	3		3	4	4		entfällt	5	CK
OeCa-LK PCR negativ	3	2	2		2	1	1		entfällt		CK
Panc-LK PCR positiv	14	17	19		15	17	17		19	21	CK
Panc-LK PCR negativ	7	4	2		6	4	4		2		CK
Colon-LK PCR positiv	11	16	16		13	17	18		16	21	CK
Colon-LK PCR negativ	10	5	5		8	4	3		5		CK
Σ LK EpCAM	9/0 <b>0</b>	9/0 0	9/0 0 <b>0</b>		9/0 <b>0</b>	9/0 0	9/0 0 <b>0</b>			9	
Σ LK CK	27/20 <b>42,6</b>	36/11 23,4	38/9 19,1 <b>21,3</b>		31/16 <b>34</b>	38/9 19,1	39/8 17 <b>18,1</b>		35/7 <b>16,7</b>	47	
Σ LK gesamt	36/20 <b>35,7</b>	45/11 19,6	47/9 16,1 <b>17,6</b>		40/16 <b>28,6</b>	47/9 16,1	48/8 14,3 <b>15,2</b>		35/7 <b>16,7</b>	56	
Σ EpCAM	49/6 <b>10,9</b>	50/5 9,1	49/6 10,9 <b>10</b>		46/9 <b>16,4</b>	50/5 9,1	47/8 14,5 <b>11,8</b>			55	
Σ EpCAM & EpCAM/CK	93/28 <b>23,1</b>	100/21 17,4	103/18 14,9 <b>16,1</b>		97/24 <b>19,8</b>	111/10 8,3	105/16 13,2 <b>10,7</b>			121	
Σ CK & EpCAM/CK	213/86 <b>28,8</b>	233/66 22,1	238/61 20,4 <b>21,2</b>		227/72 <b>24,1</b>	269/30 10	272/27 9 <b>9,5</b>			299	
Σ CK	169/64 <b>27,5</b>	183/50 21,5	184/49 21 <b>21,2</b>		176/57 <b>24,5</b>	208/25 10,7	214/19 8,2 <b>9,4</b>		76/9 <b>10,6</b>	233	
Σ gesamt	262/92 <b>26</b>	283/71 20,1	287/67 18,9 <b>19,5</b>		273/81 <b>22,9</b>	319/35 9,9	319/35 9,9 <b>9,9</b>		76/9 <b>10,6</b>	354	

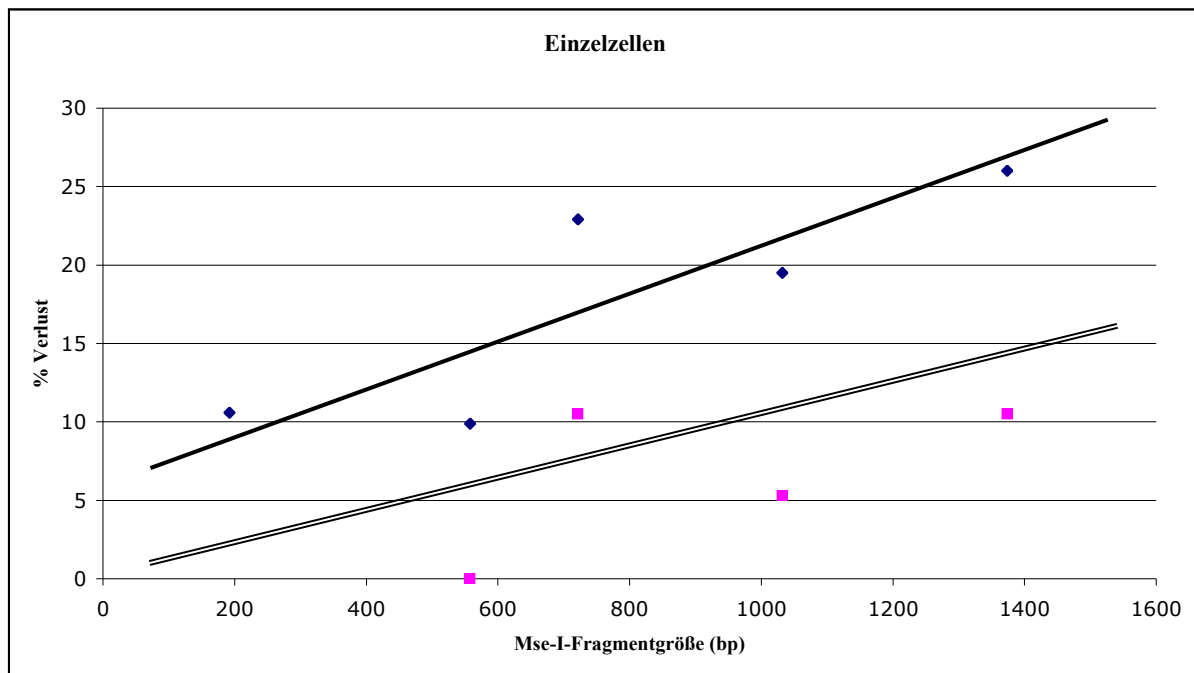
Für eine Wertung des Einflusses des Detektionsantikörpers erscheinen die Fallzahlen zu gering: Wie in der Dissertationsarbeit von Bernhard Polzer dargelegt, wurde im Kollektiv der Prostatakarzinompatienten jeweils ein Teil der Proben mit einem Cytokeratin-Antikörper, ein Teil mit einem EpCAM-Antikörper sowie ein weiterer Teil mittels Cytokeratin-EpCAM-Doppelfärbung untersucht. Die hierbei nachgewiesenen disseminierten Tumorzellen stellen zwei Subpopulationen von Tumorzellen dar, deren Frequenz des Nachweises sich im Falle des Prostatakarzinoms mit zunehmendem Krankheitsstadium geändert hat: Der Anteil der Cytokeratin-positiven Zellen nahm bei Prostatakarzinom mit zunehmendem Tumorstadium ab, der Anteil EpCAM-positiver Zellen stieg dagegen an (näheres siehe Dissertationsarbeit von Bernhard Polzer).

Abb. 7a zeigt einen zumindest leichten Anstieg des Signalverlusts bei der EpCAM/Cytokeratin-Doppelfärbung von disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark im Vergleich zur alleinigen Cytokeratinfärbung, wohingegen die Signalverluste bei der alleinigen EpCAM-Färbung über die unterschiedlichen Mse-I-Fragmente annähernd gleich blieben.

Die alleinige EpCAM-Färbung wurde bei den Bronchialkarzinompatienten verwendet. Im darauf folgenden Protokoll schließt sich eine kombinierte cDNA-Synthese und DNA-Fällung dann unverändert das Mse-I-Adapter-PCR-Protokoll an (Klein *et al.*, 2002). Es lässt sich - bei geringer Zellzahl (46 aus dem Knochenmark sowie 9 aus Lymphknoteneinzelsuspensionen gewonnene disseminierte Tumorzellen) ein in etwa gleichbleibender Signalverlust von gemittelt 14,7% (12-19,6%) bei aus dem Knochenmark isolierten Tumorzellen über alle Mse-I-Fragmentgrößen von 558 bp - 1374 bp beobachten. Auffällig ist weiterhin, dass es im Gegensatz zu den größeren Signalverlusten bei CK<sup>+</sup>-Zellen in Medimachine-generierten Lymphknoten-Einzelsuspensionen bei anderen Tumorentitäten hier zu überhaupt keinem Signalverlust kam (s. Tabelle 6).

Abb. 7a, b, c: Mse-I-Fragmentverlust bei Einzelzellen in Abhängigkeit zur Mse-I-Fragmentgröße (Legende umseitig)





Die Abbildung gibt einen annähernden Überblick über die mit steigender Mse-I-Fragmentgröße zunehmende Häufigkeit eines Signalverlusts bei Einzelzellen:

Abb. 7a: Signalverlust bei aus dem Knochenmark isolierten disseminierten Tumorzellen (Quadrate / durchgezogene Linie: EpCAM/CK-Doppelfärbung [n = 66]; Rauten / gepunktete Linie: EpCAM-Färbung [n = 46], Dreiecke, gestrichelte Linie: Cytokeratinfärbung [n = 186])

Abb. 7b: Signalverlust bei aus Lymphknotensuspensionen isolierten disseminierten Tumorzellen (Quadrate: Cytokeratinfärbung [n = 47], Rauten: EpCAM-Färbung [n = 9])

Abb. 7c: Signalverlust bei aus dem Knochenmark isolierten disseminierten Tumorzellen (Quadrate: ungefärbte, aus dem Knochenmark isolierte Normalzellen [n = 19], Rauten: sämtliche Tumorzellen, unabhängig vom Detektionsantikörper [n = 354])

### 3.1.2 Signalverlust der PCR aus formalinfixiertem und paraffineingebetteten vs. kryokonserviertem Gewebe

Bei DNA-Isolation aus Primärtumoren zeigt sich erwartungsgemäß kryokonserviertes Gewebe formalinfixiertem und paraffineingebetteten Gewebe (FFPE) deutlich überlegen: Auch unter Verwendung der Mse-I-Adapter-PCR (Stoecklein *et al.*, 2002) erscheint lediglich bei Mse-I-Fragmenten von 192 und 558 bp eine Analyse von formalinfixiertem und paraffineingebetteten Gewebe überhaupt sinnvoll:

Es wurden 83 formalinfixierte und paraffineingebettete Primätumorschnitte von 47 Mamma-, Oesophagus-, Pankreas- und Colonkarzinompatienten sowie 55 Kryogewebschnitte von 27 Bronchial- und Prostatakarzinompatienten untersucht. Die betroffenen Tumorzellareale wurden durch Lasermikrodissektion vom umliegenden Stroma isoliert.

In Tabelle 7 ist der bei den Primärtumorschnitten aus formalinfixiertem und paraffineingebetteten Gewebe mit zunehmender Mse-I-Fragmentgröße ausgeprägte Signalverlust dargestellt: Er liegt bei den kleineren Mse-I-Fragmenten von 192 bp oder 558 bp noch bei durchschnittlich 9,3% oder 27,1%, steigt dann aber deutlich an. So liegt der Verlust beim Mse-I-Fragment von 722 bp bei 53%, bei 1032 bp bei 60,8% und bei 1374 bp sogar bei 77,1%. Je nach Tumorentität (MaCa = Mammakarzinom, OeCa = Oesophaguskarzinom, Panc = Pankreaskarzinom und Colon = Colonkarzinom) schwankten diese Werte zudem noch, so war im größten Mse-I-Fragment beim Mammakarzinom ein Signalverlust von 53,9%, bei Colonkarzinom aber von 96,8% zu verzeichnen (s. auch Abbildung 8a).

**Tabelle 7a: Prozentuale Signalverluste in Abhängigkeit von Mse-I-Fragmentgröße bei formalinfixiertem, paraffineingebetteten Gewebe (Legende umseitig)**

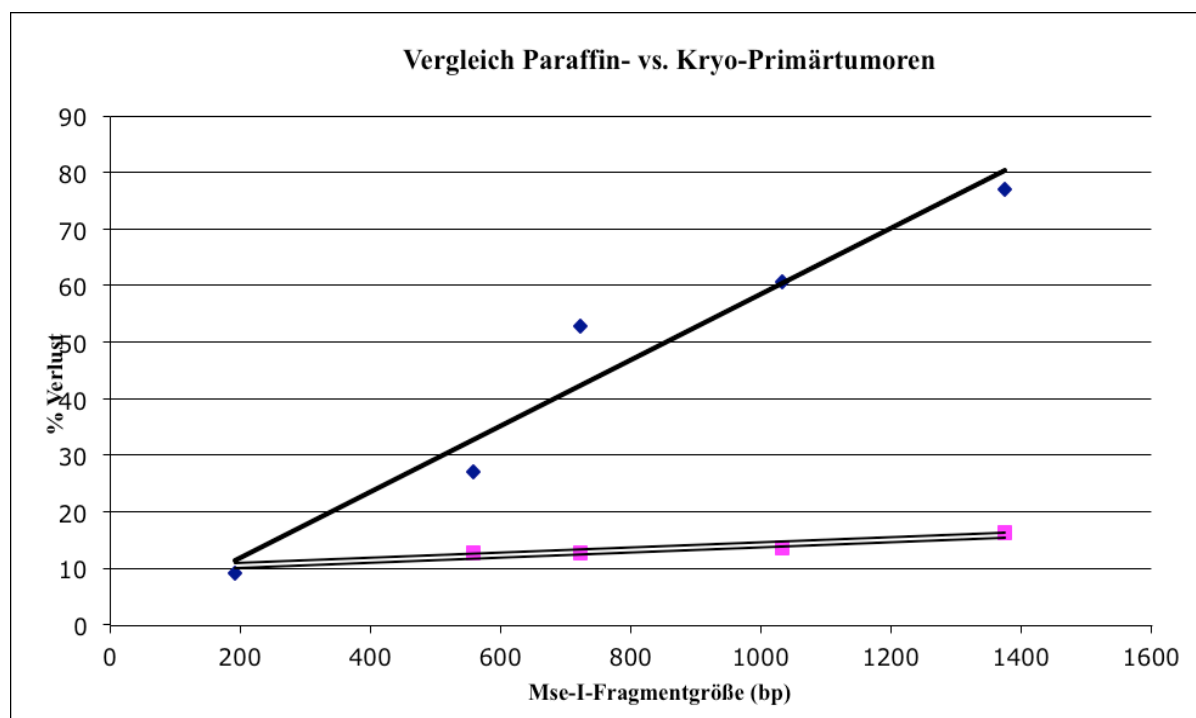
PCR-Fragment	exon 4	%	exon 5	%	exon 6	%	ges.-%	exon 7	%	exon 8	%	exon 9	%	ges.-%	ras	%	Σ
Mse-I-Fragment-Größe	1374 bp		1032 bp				722 bp		558 bp				192 bp				
MaCa-PT positiv	12		13		16			15		17		17			entfällt		26
MaCa-PT negativ	14		13		10			11		9		9			entfällt		
Σ		<b>53,9</b>		50		38,5	<b>44,2</b>		<b>42,3</b>		34,6		34,6	<b>34,9</b>			
OeCa-PT positiv	3		3		3			3		3		3			entfällt		4
OeCa-PT negativ	1		1		1			1		1		1			entfällt		
Σ		<b>25</b>		25		25	<b>25</b>		<b>25</b>		25		25	<b>25</b>			
Panc-PT positiv	3		8		16			13		20		18			22		22
Panc-PT negativ	19		14		6			9		2		4			0		
Σ		<b>86,4</b>		63,6		27,3	<b>45,5</b>		<b>40,1</b>		9,1		18,2	<b>13,6</b>		<b>0</b>	
Colon-PT positiv	1		2		4			8		21		22			26		31
Colon-PT negativ	30		29		27			23		10		9			5		
Σ		<b>96,8</b>		93,5		87,1	<b>90,2</b>		<b>74,2</b>		32,3		29	<b>30,6</b>		<b>16,1</b>	
Σ gesamt		<b>77,1</b>		68,7		46,3	<b>60,8</b>		<b>53</b>		26,5		27,7	<b>27,1</b>		<b>9,3</b>	83

In der Gruppe der Tumorschnitte aus kryokonserviertem Gewebe war das beim Prostatakarzinom verwendete Mse-I-Adapterprotokoll mit keinem einzigen Signalverlust dem beim Bronchialkarzinom zur Anwendung gekommenen Protokoll zur simultanen Isolation von mRNA und DNA überlegen (Tabelle 7b sowie Abbildung 8b). Beim letzteren kam es je nach Mse-I-Fragmentgröße zu Verlusten von 23,3-30%.

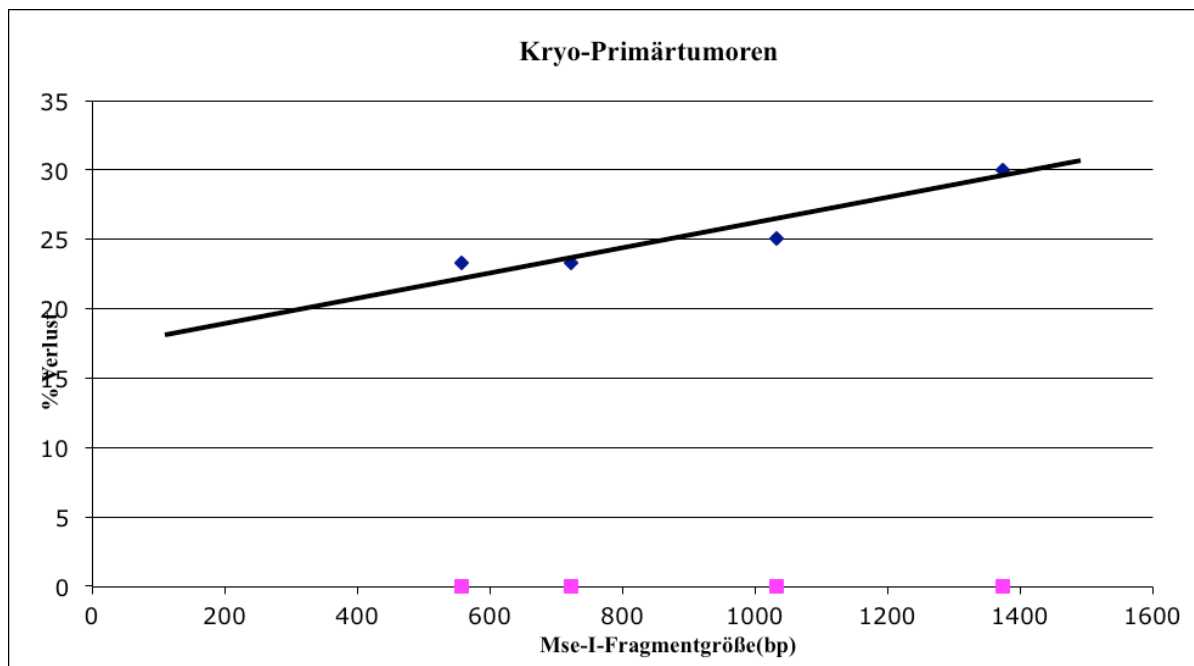
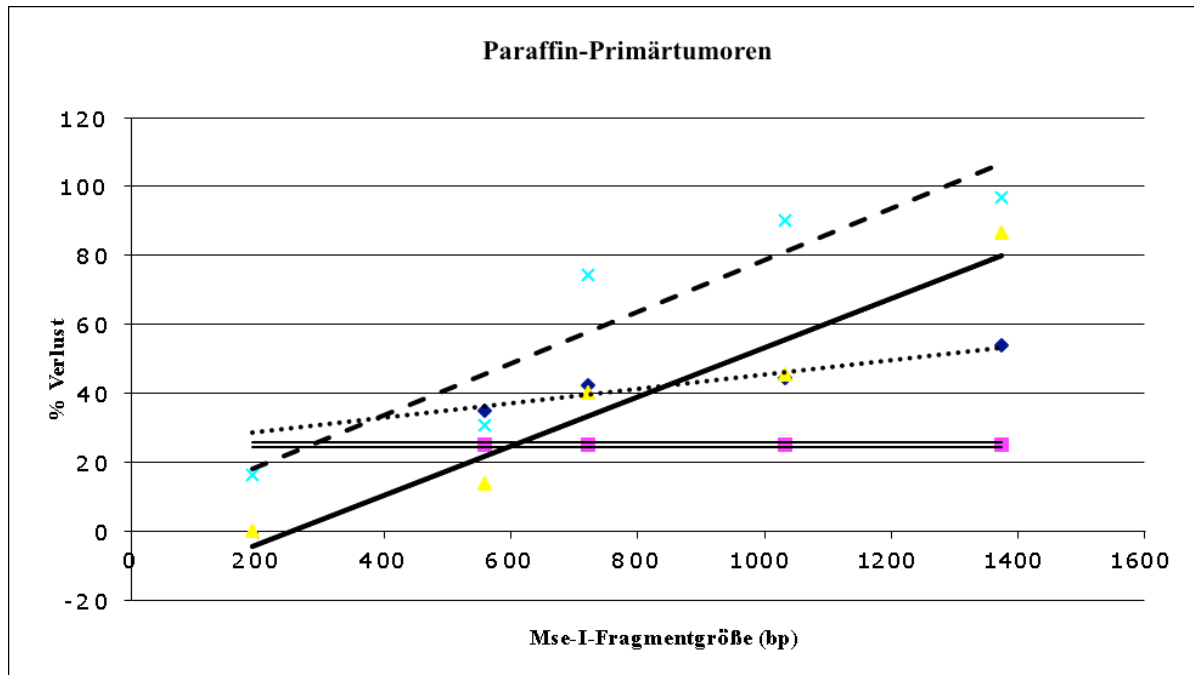
**Tabelle 7b: Prozentuale Signalverluste in Abhängigkeit von Mse-I-Fragmentgröße bei kryokonserviertem Gewebe**

PCR-Fragment	exon 4	%	exon 5	%	exon 6	%	ges.-%	exon 7	%	exon 8	%	exon 9	%	ges.-%	Σ
Mse-I-Fragment-Größe	1374 bp		1032 bp				722 bp		558 bp						
PC-PT positiv	24		24		24			24		24		24			24
PC-PT negativ	0		0		0			0		0		0			
Σ		0		0		0	0		0		0		0	0	
BC-PT positiv	21		22		23			23		24		22			30
BC-PT negativ	9		8		7			7		6		8			
Σ		30		26,7		23,3	25		23,3		20		26,7	23,3	
Σ gesamt		16,4		14,5		12,7	13,6		12,7		10,9		14,5	12,7	54

**Abb. 8: Mse-I-Fragmentverlust bei Primärtumoren in Abhängigkeit zur Art der Konservierung (FFPE = Rauten, kryokonservierte Tumoren = Quadrate) sowie zur Mse-I-Fragmentgröße**



**Abb. 8a & b: Mse-I-Fragmentverlust detailliert nach Primärtumoren in Abhängigkeit zur Art der Konservierung sowie zur Mse-I-Fragmentgröße**



Oben (a): Signalverluste bei paraffineingebetteten Primärtumorschnitten (Quadrate: Oesophaguskarzinom [n = 4], Rauten: Mammakarzinom [n = 26], Dreiecke: Pankreaskarzinom [n = 22], Kreuze: Colonkarzinom [n = 31]). Unten (b): Signalverluste bei kryo-konservierten Primärtumorschnitten (Quadrate: Primärtumorschnitte nach Mse-I-Adapterprotokoll [Prostatakarzinom, n = 24], Rauten: Primärtumorschnitte nach Protokoll zur simultanen Isolation von mRNA und DNA [Bronchialkarzinom, n = 30])

### 3.1.3 Etablierung und Sensitivität der SSCP

#### 3.1.3.1 Etablierung der SSCP mit Kontrollzelllinien

Für die SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism Analysis) wird bei einer PCR-Fragmentlänge von bis zu 300 bp eine Sensitivität von etwa 80% angegeben (Orita *et al.*, 1989; Glavac *et al.*, 1993; Hayashi *et al.*, 1993). Demzufolge wurde beim Primerdesign auf ein Abdecken der exons 4-9 des *TP53*-Gens, innerhalb derer mehr als 97% aller *TP53*-Mutationen liegen (Petitjean *et al.*, 2007), sowie des exon 2 des *KRAS*-Gens mit möglichst kurzen Primerpaaren geachtet:

p53 ex. 4 I	337 bp PCR-Fragment-Länge
p53 ex. 4 III	148 bp PCR-Fragment-Länge
p53 ex. 4 IV	269 bp PCR-Fragment-Länge
p53 ex. 5	252 bp PCR-Fragment-Länge
p53 ex. 6	159 bp PCR-Fragment-Länge
p53 ex. 7	188 bp PCR-Fragment-Länge
p53 ex. 8	248 bp PCR-Fragment-Länge
p53 ex. 9	147 bp PCR-Fragment-Länge
ras ex.2	168 bp PCR-Fragment-Länge

Das mit 337 bp längste PCR-Fragment p53 ex. 4 I diente ausschließlich der Detektion des codon-72-Polymorphismus, die beiden anderen Primerpaare deckten die exon 4-Sequenz überlappend ab.

Wie im Methodenteil bereits beschrieben wurden zur Steigerung der Sensitivität sämtliche PCR-Produkte in einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel mit und ohne 5% Glycerin geladen; der Nachweis eines Laufunterschiedes in einem der beiden Gele führte zu einer anschließenden Kontrolle durch Sequenzierung.

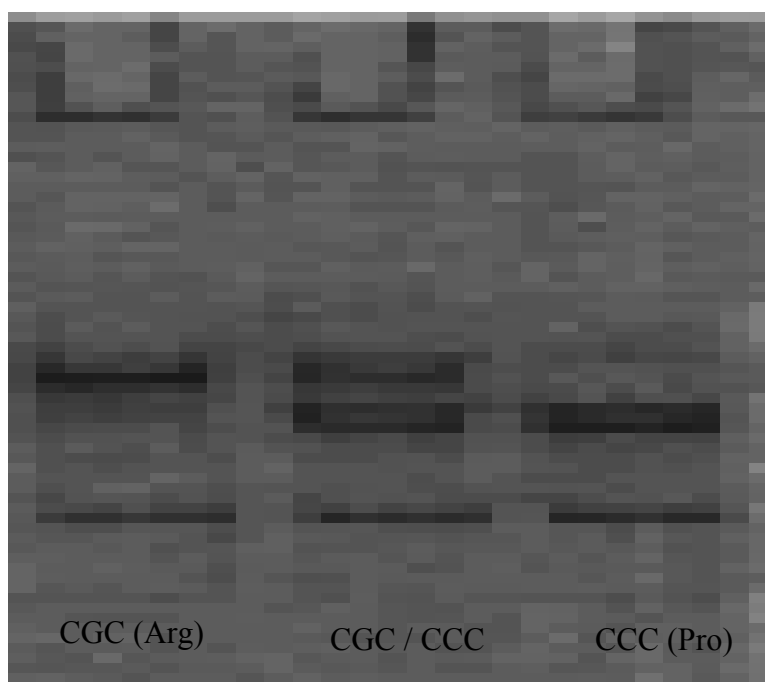
In der *TP53*-Datenbank der IARC (International Agency for Research on Cancer) (Hollstein *et al.*, 1994) wurden sieben Zelllinien mit neun bekannten *TP53*-Mutationen in den Exons 4 - 9 herausgesucht. (Tabelle 8). Zusätzlich wurden vier Patientenproben mit bekannter *TP53*-Mutation / *TP53*-codon-72-Polymorphismus zur Etablierung der SSCP herangezogen. Als Postivkontrolle für die Mutationen in den Codon 12 des *KRAS*-Gens (mit über 90% aller beschriebenen *KRAS*-Mutationen) diente die auch für die Etablierung der *TP53*-SSCP verwendete Zelllinie SW480. Als Negativkontrollen wurden humane Placenta-DNA sowie gepoolte DNA aus PBL von gesunden Normalspendern verwendet.



**Tabelle 8: Zelllinien zur Etablierung der *TP53*- sowie *KRAS*-SSCP**

exon	Zelllinie	ATCC-Nr.	Herkunft	cd.	aus	wird	Mutation
<b>p53 ex. 4</b>	Patient BN			72	CCC		
	Patient DN			72	CCC / CGC		
	Patient MN			72	CGC		
	UM-UC-3	CRL-1749	Blasenkarzinom	113	TTC	TGC	Punktm.
<b>p53 ex. 5</b>	BT-20	HTB-19	Mammakarzinom	132	AAG	CAG	Punktm.
	Panc Tu-1	N.Lemoine	Pankreaskarzinom	176	TGC	AGC	Punktm.
<b>p53 ex. 6</b>	T-47D	HTB-133	Mammakarzinom	194	CTT	TTT	Punktm.
	Raji	CCL-86	Burkitt-Lymphom	213	CGA	CAA	Punktm.
	Patient N.			215	AGT	GGT	Punktm.
<b>p53 ex. 8</b>	SW480	CCL-228	Colonkarzinom	273	CGT	CAT	Punktm.
	J 82	HTB-1	Blasenkarzinom	274	GTT	TTT	Punktm.
<b>p53 ex. 9</b>	SW480	CCL-228	Colonkarzinom	309	CCC	TCC	Punktm.
	J 82	HTB-1	Blasenkarzinom	320	AAG	AAC	Punktm.
<b>ras ex 2</b>	SW480	CCL-228	Colonkarzinom	12	GGT	GTT	heterozyg

Unter den im Methodenteil genannten Laufbedingungen konnten sämtliche Punktmutationen sowie der *TP53*-Codon-72-Polymorphismus detektiert werden (Abbildung 9).

**Abb. 9: *TP53*-Codon-72-Polymorphismus**

*Sowohl die heterozygote Variante (CGC / CCC) wie auch die homozygoten Varianten des Codon 72 können im SSCP-Gel eindeutig voneinander unterschieden werden*

### 3.1.3.2 Kontrolle der SSCP-Bedingungen mit weiteren Zelllinien

Unter den so etablierten Bedingungen wurden weitere sieben Zelllinien mit acht bekannten, zuvor durch Sequenzierung bestätigten *TP53*-Mutationen untersucht sowie eine weitere, tetraploide Zelllinie (Panc-Tu-1) mit homozygoter *KRAS*-Mutation.

Hierbei konnten für das *TP53*-Gen sieben von acht (87,5%) Punktmutationen / Deletionen / Amplifikationen unter den etablierten Bedingungen detektiert werden, lediglich die Exon-8-Mutation im Codon 274 zeigte keinen Laufunterschied in der SSCP. Insgesamt hat die SSCP für das *TP53*-Gen bei PCR-Fragment-Längen von 147 - 269 bp damit eine Sensitivität von  $20/21 = 95\%$ . Für das *KRAS*-Gen betätigte auch die Kontroll-SSCP die Spezifität der etablierten Bedingungen.

**Tabelle 9: Zelllinien zur Kontrolle der *TP53*- sowie *KRAS*-SSCP-Bedingungen**

exon	Zelllinie	ATCC-Nr.	Herkunft	cd.	aus	wird	Mutation
<b>p53 ex. 5</b>	K-562	CCL-243	CML	136	-	-	Amp. +1
	PC3	CRL-1435	Prostatakarzinom	138	-	-	Delet. -1
	H69AR	CRL11351	Bronchial-Ca.	171	GAG	TAG	Punktm.
<b>p53 ex. 6</b>	DU145	HTB-81	Prostatakarzinom	223	CCT	CTT	Punktm.
<b>p53 ex. 7</b>	HT-3	HTB-32	Cervixkarzinom	245	GGC	GTC	Punktm.
	Colo 320	CCL-220.1	Colonkarzinom	248	CGG	TGG	Punktm.
<b>p53 ex. 8</b>	A-431	CRL-1555	epidermoides Ca.	273	CGT	CAT	Punktm.
	DU145	HTB-81	Prostatakarzinom	274	GGT	TTT	Punktm.
<b>ras ex 2</b>	Panc Tu-1	N.Lemoine	Pankreaskarzinom	12	GGT	GTT	homozyg

Eine letzte, erst im Laufe der Arbeit entstandene, Qualitätskontrolle besteht in der vollständigen Detektion sämtlicher *KRAS*-Mutation in den Codons 12 (GGT) und 13 (GGC) (s. Tab. 14 im Anhang): Da im genetischen Code ein mit Guanin beginnendes Codon unabhängig von der an dritter Stelle stehenden Nukleobase nur für Glycin kodieren kann, sind jeweils sechs Mutationen denkbar: Für das Codon 12 sind all diese im Verlauf der Arbeit durch die SSCP gefunden worden. Im deutlich seltener alterierten Codon 13, welches in 5% der colorektalen Tumoren mutiert ist (Morelli *et al.*, 2012), wird nahezu ausschließlich ein Austausch von GGC zu GAC beschrieben; auch dieser konnte mit Hilfe der SSCP detektiert werden.

### 3.1.4 Allelverlust

Nach der Beurteilung des vollständigen Signalverlusts in der PCR unter 3.1.1 wurde im folgenden der Verlust einzelner Allele untersucht. Hierzu wurden in der SSCP heterozygote Mutationen oder Polymorphismen ausgewählt. Im einzelnen waren dies: Der Codon-72-Polymorphismus im *TP53*-Gen, eine Punktmutation im Exon 6 des *TP53*-Gens sowie eine Punktmutation im *KRAS*-Gen.

#### Codon-72-Polymorphismus

Das Codon 72 im Exon 4 des *TP53*-Gens kodiert für zwei unterschiedliche p53-Proteine: Es wird eine für Arginin kodierende CGC-Sequenz von einer für Prolin kodierenden CCC-Sequenz unterscheiden. Ob die Arginin-Form eine erhöhte Suszeptibilität für Cervix- oder andere Karzinome aufweist, ist noch immer nicht zweifelsfrei geklärt (Storey *et al.*, 1998; Koushik *et al.*, 2004; Whibley *et al.*, 2009), es wird aber zumindest eine stärkere Bindung und damit Degradation der Arginin-Form des p53-Proteins durch das HVP-E6-Onkoprotein diskutiert.

Die heterozygote Variante des Codon 72 sollte im folgenden zur Quantifizierung des Allelverlusts benutzt werden: Es wurden einzelne Zellen der triploiden Blasenkarzinom-Zelllinie J82 sowie periphere Blutlymphozyten von gesunden Spendern untersucht. Diese wurden zum einen direkt ohne weitere Färbung aus Zellsuspensionen isoliert, zum anderen erfolgte der unter „Material und Methoden“ geschilderte Ablauf der Sedimentierung auf Haft-Objektträgern (HOT) mit anschließender Isolation nach Antikörperfärbung.

**Tabelle 10a: Allelverluste im Codon 72 des *TP53*-Gens in der SSCP**

	EZ	beide Allele detektiert	nur ein Allel detektiert	vollst. Signalverlust
<b>J82 Susp.</b>	10	5	5	0
<b>J82 HOT</b>	10	6	4	0
<b>PBL Susp.</b>	10	7	2	1
<b>PBL HOT</b>	10	5	4	1

In der anschließenden SSCP waren ohne Glycerin die in Tabelle 10a angegebenen Detektionstraten zu verzeichnen. Bei einer Mse-I-Fragmentlänge von 1374 bp zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen direkt aus der Suspension gewonnenen sowie von Haft-Objektträgern (HOT) isolierten Zellen, so daß die Einzelzellen für die folgenden Untersuchungen direkt aus der Suspension gepickt wurden. Unter Annahme eines triploiden Chromosomensatzes wurden bei 10 J82-Einzelzellen lediglich  $5 \times 2 + 5 = 15$  bzw.  $6 \times 2 + 4 = 16$  von 30 Allelen detektiert, was einem artefiziellen Allelverlust von 50% bzw. 46,7% entspricht. Etwas besser stellen sich die Ergebnisse der PBL dar: Hier erbrachten von 20 möglichen Allelen  $14 + 2 = 16$  bzw.  $10 + 4 = 14$  eine Bande in der SSCP, was 20% bzw. 30%

Allelverluste bedeutet.

#### **Punktmutation im exon 6 des *TP53*-Gens**

Die diploide Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji enthält eine heterozygote Punktmutation im Codon 213 des *TP53*-Gens. Die SSCP mit 5% Glycerin konnte bei einer Mse-I-Fragmentlänge von 1032 bp  $5 \times 2 + 4 = 14$  von 20 möglichen Banden nachweisen.

**Tabelle 10b: Allelverluste im Codon 213 des *TP53*-Gens in der SSCP**

	EZ	beide Allele detektiert	nur ein Allel detektiert	vollst. Signalverlust
<b>Raji</b>	10	5	4	1

Dies entspricht einem artifiziellen Allelverlust von 30%.

#### **Punktmutation im *KRAS*-Gen**

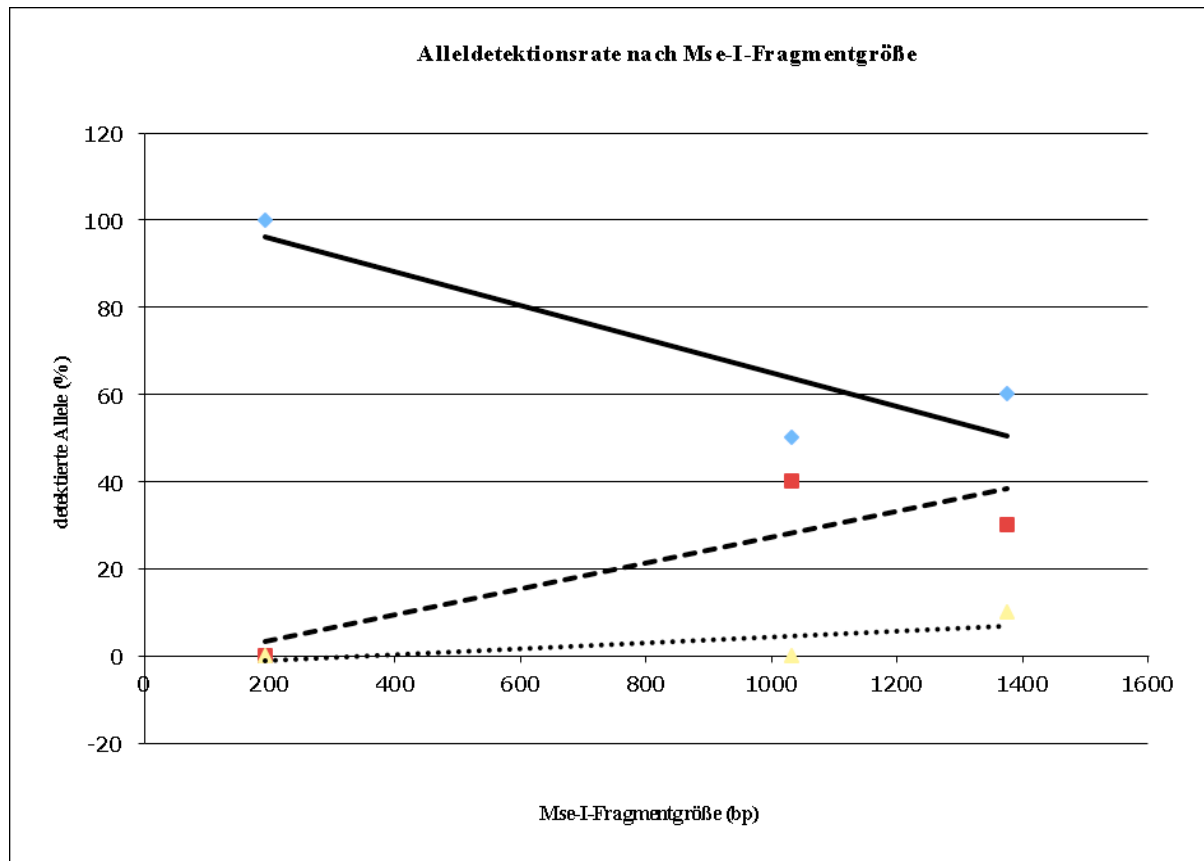
Bei der hypotriploiden Colonkarzinom-Zelllinie SW480 schließlich konnten sämtliche Allele der heterozygoten Mutation im Codon 12 des des *KRAS2*-Gens (Mse-I-Fragmentlänge von 192 bp) in der SSCP nachgewiesen werden:

**Tabelle 10c: Allelverluste im Codon 12 des *KRAS*-Gens in der SSCP**

	EZ	beide Allele detektiert	nur ein Allel detektiert	vollst. Signalverlust
<b>SW480</b>	10	10	0	0

Mittelt man die Ergebnisse der diploiden Einzelzellen (PBL, Raji, SW480), so kommt man auf einen Allelverlust von 20%: Bei 80 maximal möglichen Signalen von 40 Einzelzellen konnten 16 bzw. 14 Signale beim Codon-72-Polymorphismus des *TP53*-Gens, 14 im Codon 213 des *TP53*-Gens sowie 20 im Codon 12 des *KRAS*-Gens nachgewiesen werden.

Diese Daten decken sich ein etwa mit der von Julian Schardt in seiner Dissertation beschriebenen durchschnittlichen Wahrscheinlichkeit eines artifiziellen Allelverlusts von 16%. Im Gegensatz zur dort fehlenden statistischen Korrelation mit der Länge des Mse-I-Fragments oder der Länge der PCR-Produkts ist bei dieser Untersuchung ein zunehmender Allelverlust mit steigender Mse-I-Fragmentgröße zu verzeichnen - was auch im Einklang zur eingangs untersuchten Rate genereller Signalverluste steht (s. Abbildung 10).

**Abb. 10:** Alleldetektionsrate in Abhängigkeit von der Mse-I-Fragmentgröße

Ergebnisse diplotider Einzelzellen: Beide Allele detektierbar (Rauten), ein Allel detektierbar (Quadrate), beide Allele nicht detektierbar (Dreiecke).

### 3.2 Spezifität

Zur Klärung der Frage, in wie weit ein in der SSCP gefundenes unterschiedliches Laufverhalten wirklich eine Mutation darstellt, wurden sämtliche Proben mit abweichendem Laufverhalten sequenziert. Da bei der Heterogenität der disseminierten Tumorzellen (Klein *et al.*, 2002) allerdings keine Aussage über die eine möglicherweise artefiziell eingeführte Mutation gemacht werden kann, lag das Augenmerk auf Laufunterschieden von cytokeratin-negativen, dementsprechend als „normal“ anzunehmenden Zellen.

Die Gefahr des Einfügens einer Mutation durch die natürliche Fehlerrate der PCR erscheint bei der Analyse von einzelnen Zellen besonders hoch, da sich bei einem Ausgangsmaterial von nur zwei Genomkopien ein Fehler im ersten Schritt DNA-Synthese im Rahmen des Mse-I-Adapter-PCR-Protokoll mit hoher Wahrscheinlichkeit bemerkbar machen würde.

Die Fehlerrate der Taq-Polymerase weist laut Literatur Schwankungen um in etwa den Faktor 10 auf, von  $2 \times 10^{-4}$  bis  $1,2 \times 10^{-5}$  (Eckert *et al.*, 1990) und wird von verschiedenen anderen Autoren mit  $2,1 \times 10^{-4}$ ;  $8,9 \times 10^{-5}$ ;  $7,2 \times 10^{-5}$  bis zu  $8,0 \times 10^{-6}$  beziffert (Keohavong *et*

al., 1989; Cariello et al., 1991; Ling et al., 1991; Cline et al., 1996). Deswegen wird die Mse-I-PCR und Reamplifikation mit dem Expand Long Template PCR System durchgeführt. Hierbei wird eine Mischung von Taq- und Pwo-DNA-Polymerase verwendet. Aufgrund der Proofreading(3'-5'Exonuklease)-Aktivität der Pwo-Polymerase wird eine reduzierte Fehlerrate angegeben:  $1,5 \times 10^{-5}$  gegen  $2,6 \times 10^{-5}$  für die Taq-Polymerase des gleichen Herstellers (Frey et al., 1995).

In dem Kollektiv der Normalzellen kam es in der *TP53*-SSCP zu vier Laufunterschieden. Bei der nachfolgenden Sequenzierung stellt sich eine Laufauffälligkeit als falsch positiv heraus (*TP53*-Exon-6-Wildtypsequenz), bei den übrigen Zellen zeigt sich eine Änderung der Gensequenz: Bei einer Normalzelle kam es zu einer heterozygoten Deletion im Codon 249 des Exon 7, die in keiner weiteren Normal- oder Tumorzelle nachweisbar war. Somit ist mit größter Wahrscheinlichkeit von einem artifiziellen Verlust auszugehen.

Etwas schwieriger ist eine übereinstimmende homozygote stumme *TP53*-Mutation bei zwei Normalzellen im Exon 4, Codon 36 (CCG -> CCA [Pro -> Pro]) zu werten. Die Sequenzierung der betreffenden Gensequenz einer Tumorzelle des gleichen Patienten mit unauffälligem Laufverhalten in der SSCP erbrachte eine Wildtypsequenz, so dass in diesem Fall am ehesten ein Mosaik vorliegt.

Da sich, wie oben dargelegt, ein durch die PCR eingeführter Fehler in den ersten Schritten, wenn nicht **dem** ersten Schritt der PCR manifestieren müsste, um nicht von der Vielzahl korrekter Kopien in den Hintergrund gedrängt zu werden, ergibt sich folgende Rechnung:

$$\frac{\text{Auffälligkeit einer Normalzelle}}{\text{Basenzahl der untersuchten Mse-I-Fragmente}} = \text{Fehlerrate der Polymerase}$$

In der folgenden Tabelle wird deshalb die Zahl der amplifizierten Basen der vier mittels *TP53*-SSCP untersuchten Mse-I-Fragmente von 19 Normalzellen ermittelt und in Relation zu der einen, anzunehmenderweise artifiziellen, Deletion im Codon 249 gesetzt:

**Tabelle 11: Basenzahl der Mse-I-Fragmente von 19 untersuchten Normalzellen**

Mse-I-Fragment	Mse-I-Fragmente gesamt	PCR-Primer	PCR-Fragmente gesamt
p53 ex 2-4	26.106 Basen	p53 ex. 4 I	6.403 Basen
		p53 ex. 4 III	2.812 Basen
		p53 ex. 4 IV	5.111 Basen
		p53 ex. 5	4.788 Basen
p53 ex 5-6	19.608 Basen	p53 ex. 6	3.021 Basen
		p53 ex. 7	3.572 Basen
p53 ex 7	13.718 Basen	p53 ex. 8	4.712 Basen
p53 ex 8-9	11.172 Basen	p53 ex. 9	2.793 Basen
$\Sigma$	70.034 Basen		33.212 Basen

Damit ergibt sich mit einem Fehler auf 70.034 Basen eine Fehlerrate von  $1,4 \times 10^{-5}$ , was noch knapp unterhalb der vom Hersteller angegebenen Fehlerrate des Expand Long Template PCR Systems von  $1,5 \times 10^{-5}$  liegt.

Vierunddreißig Laufunterschiede von 354 Tumorzellen (9,6%) haben sich in der Sequenzierung als nicht auffällig erwiesen, ebenso stellten sich 13 Laufunterschiede bei 139 Primärtumorearen (9,4%) nach Sequenzierung als in der SSCP falsch positiv heraus.

### 3.3 TP53

Zur Auswertung wurden ausschließlich Einzelzellen herangezogen, bei denen auch ein Primärtumor analysiert werden konnte. Ein positiver Nachweis einer TP53-Mutation durch SSCP-Analyse der Exons 4-9 ließ sich erbringen bei

- 8 / 15 Bronchialkarzinomen
- 3 / 12 Prostatakarzinomen
- 4 / 17 Mammakarzinomen
- 2 / 2 Oesophaguskarzinomen
- 4 / 11 Pankreaskarzinomen
- 6 / 16 Colonkarzinomen

Hierbei wurde sowohl eine Mutation in einem Primärtumor, einer Einzelzelle wie auch eine Mutation in beiden korrespondierenden Proben gewertet. Im folgenden sind die genauen Mutationen mit der Angabe des mutierten Codons und dem daraus folgenden Aminosäureaustausch jeweils für jede Tumorentität einzeln verzeichnet. (Tab. 12a-f). Abb. 12 gibt darüber hinaus einen Überblick über die vergleichsweise geringe Frequenz von TP53-Mutationen je nach Tumortyp in absoluten Zahlen.

Nimmt man sämtliche Mutationen in Einzelzelle, Primärtumor und Einzellzelle-Primärtumorpaar zusammen, kommt man auf eine Mutationsrate von 53,3% bei den untersuchten (nicht-kleinzelligen) Bronchialkarzinomen. Zwar zeigen 3 der 15 (20%) Bronchialkarzinome eine Mutation sowohl im Primärtumor wie auch in einer oder mehreren Einzelzellen, allerdings ist nur bei zwei dieser Paare (BC-2 und BC-4) die Mutation im Primärtumor wie auch in der Einzelzelle die gleiche, bei BC-3 liegt eine *TP53*-Mutation des Primärtumors in Codon 273 vor, zwei der fünf analysierten Einzelzellen tragen eine Mutation im Codon 298. Immerhin 3 der 15 (20%) Bronchialkarzinome (BC-1, BC-5 sowie BC-7) weisen lediglich eine Mutation in einer Einzelzelle bei unauffälliger *TP53*-Analyse des Primärtumors auf (s. Tabelle 12a [PT = Primärtumor, TZ = Einzelzelle]).

Sämtliche Mutationen wurden mit der IARC *TP53* Datenbank in der Version R16 vom November 2012 abgeglichen (Petitjean et al., 2007). Hierbei waren lediglich die stumme Mutation im Codon 213 (CGA -> CGR [Arg -> Arg]) einer disseminierten Tumorzelle (BC-5 TZ2) sowie die Mutation im Codon 70 (GCT -> GGT [Ala -> Val]) der disseminierten Tumorzelle BC-7 TZ1 nicht verzeichnet; die im folgenden Codon 71 auftretende Deletion von einer Base sowie die Mutation im Codon 257 (CTG -> CYG [Leu -> Pro]) der gleichen Zelle waren ebenso wie alle weiteren im Kollektiv der Bronchialkarzinome detektierten *TP53*-Mutationen bekannt: Die Mutation im Codon 157 (GTC -> TTC [Val -> Phe]) stellt den klassischen hot-spot einer *TP53*-Mutation beim Bronchialkarzinom dar, ist allerdings nur in einem Primärtumor (BC-6 PT1) nachweisbar. Die Mutationen im Codon 215 (AGT -> GGT [Ser -> Gly]) finden sich im Primärtumor sowie in den Einzelzellen eines Patienten (BC-4), während die Mutationen im Codon 257 (CTG -> GTT [Leu -> Pro]) sowie 298 (GAG -> TAG [Glu -> Stop]) bei jeweils zwei verschiedenen Patienten gefunden wurden.

In der IARC *TP53* Datenbank zeigt sich bei den aufgeführten Mutationen der Codons 215 und 257 keine bemerkenswerte Häufung von Bronchialkarzinomen, während dies beim Codon 298 eher der Fall ist: 10 der insgesamt 133 (7,5%) dort für das Codon 215 verzeichneten Mutationen sowie 3/66 (4,5%) der Mutationen des Codons 257 entstammen Bronchialkarzinomen. Beim Codon 298 sind dies 27/110, was einer Rate von 24,5% entspricht.



Tabelle 12a: *TP53*-Mutationen bei Bronchialkarzinompatienten

	TMN	<i>TP53</i> -Sequenz
BC-1 PT1	M0	
BC-1 PT2	M0	
BC-1 TZ1	M0	179: CAT -> TAT (His -> Tyr)
BC-2 PT1	M0	
BC-2 PT2	M0	298: GAG -> TAG (Glu -> Stop)
BC-2 TZ1	M0	298: GAG -> TAG (Glu -> Stop)
BC-3 PT1	M0	273: CGT -> CRT (Arg -> His)
BC-3 TZ1	M0	298: GAG -> TAG (Glu -> Stop)
BC-3 TZ2	M0	298: GAG -> TAG (Glu -> Stop)
BC-3 TZ3	M0	
BC-3 TZ4	M0	
BC-3 TZ5	M0	
BC-4 PT1	M0	215: AGT -> GGT (Ser -> Gly)
BC-4 NZ1	M0	
BC-4 NZ2	M0	
BC-4 NZ3	M0	
BC-4 TZ1	M0	
BC-4 TZ2	M0	215: AGT -> GGT (Ser -> Gly)
BC-4 TZ3	M0	215: AGT -> GGT (Ser -> Gly)
BC-4 TZ4	M0	215: AGT -> GGT (Ser -> Gly)
BC-5 PT1	M0	
BC-5 PT2	M0	
BC-5 TZ1	M0	
BC-5 TZ2	M0	213: CGA -> CGR (Arg -> Arg)
BC-6 PT1	M0	157: GTC -> TTC (Val -> Phe)
BC-6 TZ1	M0	
BC-6 TZ2	M0	
BC-6 TZ3	M0	
BC-6 TZ4	M0	
BC-6 TZ5	M0	
BC-7 PT1	M0	
BC-7 PT2	M0	
BC-7 PT3	M0	
BC-7 PT4	M0	
BC-7 PT5	M0	
BC-7 TZ1	M0	70: GCT -> GTT (Ala -> Val) 71: del -1 257: CTG -> CYG (Leu -> Pro)
BC-8 PT1	M0	
BC-8 PT2	M0	
BC-8 PT3	M0	257: CTG -> CYG (Leu -> Pro)
BC-8 PT4	M0	
BC-8 PT5	M0	
BC-8 TZ1	M0	
BC-8 TZ2	M0	

Im Fall der Prostatakarzinome wird bei drei *TP53*-Alterationen unter zwölf untersuchten Einzellzell-Primärtumorpaaren eine *TP53*-Mutationsrate von 25% erreicht, allerdings zeigt sich eine Mutation im Primärtumor wie auch in den Einzelzellen nur in einem Paar (PC-2), wobei die Mutation des Primärtumors sich nicht in der Einzelzelle finden läßt (und umgekehrt). In zwei Fällen weist allein der Primärtumor eine Auffälligkeit im *TP53*-Gen auf. Lediglich drei Prostatakarzinom-Einzelzellen ohne Primärtumor (M1) weisen eine klonale Mutation im Codon 245: GGC -> GRC (Gly -> Asp) auf. Sämtliche Mutationen sind nach der IARC *TP53* Datenbank bekannte Mutationen.

**Tabelle 12b: *TP53*-Mutationen bei Prostatakarzinompatienten**

	TMN	<i>TP53</i> -Sequenz
PC-1 PT1	M0/BR	213: CGA -> CGR (Arg -> Arg)
PC-1 PT2	M0/BR	
PC-1 PT3	M0/BR	
PC-1 TZ1	M0/BR	
PC-1 TZ2	M0/BR	
PC-2 PT1	M1	
PC-2 PT2	M1	
PC-2 PT3	M1	259: GAC -> KMC (Asp -> Tyr)
PC-2 TZ1	M1	
PC-2 TZ2	M1	136: CAA -> TAA (Glu -> Stop)
PC-2 TZ3	M1	136: CAA -> TAA (Glu -> Stop)
PC-2 TZ4	M1	
PC-2 TZ5	M1	
PC-2 TZ6	M1	
PC-3 PT1	M0	242: TGC -> KGC (Cys -> Ala) 2:1
PC-3 PT2	M0	242: TGC -> KGC (Cys -> Ala)
PC-3 PT3	M0	
PC-3 TZ1	M0	
PC-3 TZ2	M0	
PC-3 TZ3	M0	
PC-3 TZ4	M0	

Bei 4 von 17 (23,5%) Mammakarzinomen konnte eine *TP53*-Mutation gefunden werden, allerdings ausschließlich in Primärtumoren. Wiederum zeigen fünf Mammakarzinom-Einzelzellen, erneut leider ohne Primärtumor (M1), eine teilweise klonale Veränderung im Codon 132: AAG -> AGG (Lys -> Arg): Während drei Zellen eine heterozygote Mutation im Codon 132 aufweisen, ist diese Mutation bei einer weiteren Zelle homozygot, die letzte Zelle hat eine Codon-132-Wildtypsequenz, aber eine Mutation im Codon 200/201 sowie 202 (s. Abb. 12). All dies reflektiert sogar in der metastasierten Situation die Heterogenität dieser Zellen. Auch in der Tumorentität des Mammakarzinoms sind sämtliche Mutationen in der IARC *TP53* Datenbank verzeichnet.

**Tabelle 12c: TP53-Mutationen bei Mammakarzinompatienten**

	TMN	TP53-Sequenz
MaCa-1 PT1	M0	185 AGC -> ASC (Ser -> Thr) 2:1
MaCa-1 TZ1	M0	
MaCa-2 PT1	M0	
MaCa-2 PT2	M0	257: CTG -> CGG (Leu -> Arg)
MaCa-2 TZ1	M0	
MaCa-2 TZ2	M0	
MaCa-3 PT1	M1	
MaCa-3 PT2	M1	
MaCa-3 PT3	M1	269: AGC -> AGT (Ser -> Ser)
MaCa-3 TZ1	M1	
MaCa-3 TZ2	M1	
MaCa-3 TZ3	M1	
MaCa-3 TZ4	M1	
MaCa-4 PT1	M1	
MaCa-4 PT2	M1	282: CGG -> YGG (Arg -> Trp)
MaCa-4 TZ1	M1	
MaCa-4 TZ2	M1	
MaCa-4 TZ3	M1	
MaCa-4 TZ4	M1	
MaCa-4 TZ5	M1	
MaCa-4 TZ6	M1	
MaCa-4 TZ7	M1	

Trotz der geringen Zahl der untersuchten Oesophaguskarzinome (2) fällt auf, daß ausschließlich Einzelzellen eine TP53-Mutation aufwiesen – in beiden Fällen im hot-spot-Codon für gastrointestinale Tumoren, dem Codon 175; im Primärtumor ergab sich jeweils keine Auffälligkeit.

**Tabelle 12d: TP53-Mutationen bei Oesophaguskarzinompatienten**

	TMN	TP53-Sequenz
OeCa-1 PT1	M0	
OeCa-1 TZ1	M0	175: CGC -> CRC (Arg -> His)
OeCa-1 TZ2	M0	
OeCa-2 PT1	M0	
OeCa-2 PT2	M0	
OeCa-2 TZ1	M0	
OeCa-2 TZ2	M0	175: CGC -> CAC (Arg -> His) 292: del -1 het
OeCa-2 TZ3	M0	175: CGC -> CAC (Arg -> His)
OeCa-2 TZ4	M0	175: CGC -> CRC (Arg -> His)

Bei 4 von 11 (36,4%) Pankreaskarzinomen ließ sich eine *TP53*-Mutation finden; wiederum häufiger in den Primärtumoren (Panc-3, Panc-5 sowie Panc-7); nur in einem Fall (Panc-6) war die selbe Mutation (274: del-1) sowohl im Primärtumor wie auch in den drei zugehörigen, aus einer Lymphknotensuspension isolierten Einzelzellen nachweisbar.

Die Deletion von 51 Basenpaaren zwischen den Codons 236-253, die nur in einem der beiden Primärtumorareale von Panc-3 gefunden wurde, ist in der IARC *TP53* Datenbank nicht aufgeführt. Die weiteren Mutationen sind bekannt und sind entweder mit einem Aminosäureaustausch (Codons 275, 290 und 309) bzw. einer Verschiebung des Leserasters (Deletion-1 in Codon 274) verbunden. Interessanterweise ist die Deletion zwar zweimal in der IARC *TP53* Datenbank aufgeführt, beide Male wurde sie aber in einem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom beschrieben.

**Tabelle 12e: *TP53*- und *KRAS*-Mutationen bei Pankreaskarzinompatienten**

	TMN	<i>TP53</i> -Sequenz	<i>KRAS</i> -Sequenz
Panc-1 PT1	M0		
Panc-1 PT2	M0		12: GGT -> GRT (Gly -> Asp)
Panc-1 PT3	M0		12: GGT -> GRT (Gly -> Asp)
Panc-1 LK-TZ1	M0		
Panc-1 LK-TZ2	M0		
Panc-1 LK-TZ3	M0		12: GGT -> GRT (Gly -> Asp)
Panc-1 TZ1	M0		
Panc-1 TZ2	M0		
Panc-1 TZ3	M0		
Panc-2 PT1	M0		12: GGT -> SGT (Gly -> Arg)
Panc-2 PT2	M0		12: GGT -> SGT (Gly -> Arg)
Panc-2 TZ1	M0		
Panc-2 TZ2	M0		
Panc-3 PT1	M0	236 - 253: del - 51 het	12: GGT -> SGT (Gly -> Arg)
Panc-3 PT2	M0		12: GGT -> SGT (Gly -> Arg)
Panc-3 TZ1	M0		
Panc-4 PT1	M0		12: GGT -> GKT (Gly -> Val)
Panc-4 PT2	M0		12: GGT -> GKT (Gly -> Val)
Panc-4 TZ1	M0		
Panc-4 TZ2	M0		
Panc-5 PT1	M0	309: CCC -> TCC (Pro -> Ser)	
Panc-5 LK-TZ1	M0		
Panc-5 LK-TZ2	M0		
Panc-5 LK-TZ3	M0		
Panc-6 PT1	M0		12: GGT -> GKT (Gly -> Val)
Panc-6 PT2	M0	274: del -1 het M0 275: TGT -> TKT (Cys -> Phe)	12: GGT -> GKT (Gly -> Val)
Panc-6 LK-TZ1	M0	274: del -1 hom	12: GGT -> GKT (Gly -> Val)
Panc-6 LK-TZ2	M0	274: del -1 hom	12: GGT -> GKT (Gly -> Val)
Panc-6 LK-TZ3	M0	274: del -1 het	12: GGT -> GKT (Gly -> Val)
Panc-7 PT1	M0	291: AAG -> AAC (Lys -> Asn)	
Panc-7 LK-TZ1	M0		
Panc-8 PT1	M0		12: GGT -> GAT (Gly -> Asp)
Panc-8 LK-TZ1	M0		
Panc-8 LK-TZ2	M0		

Bei 6 von 16 Colonkarzinomen (37,5%) schließlich wurden *TP53*-Alterationen nachgewiesen, jeweils zwei in Primärtumor-Einzelzellpaaren (Colon-2, Colon-5), zwei nur im Primärtumor (Colon-8, Colon-9) und zwei in der Gruppe der Einzelzellen (Colon-1, Colon-4). Hier ist erneut zu bemerken, daß die Mutationen der Primärtumor-Einzelzellpaare keine Übereinstimmung im Sinne einer Klonalität zeigten.

In der IARC *TP53* Datenbank sind wiederum sämtliche Mutationen bekannt. Für die zweimalige Detektion einer Chromosom 12p-Sequenz in dissemierten Tumorzellen von verschiedenen Patienten (Colon-2 TZ2 sowie Colon-4 TZ1) fehlt allerdings eine schlüssige Erklärung.

**Tabelle 12f: *TP53*-, *KRAS*- und *PIK3CA*-Mutationen bei Colonkarzinompatienten**

	TMN	<i>TP53</i> -Sequenz	<i>KRAS</i> -Sequenz	<i>PI3K</i> -Sequenz
Colon-1 PT1	Mx			
Colon-1 LK-TZ1	Mx			
Colon-1 LK-TZ2	Mx	67: CCA -> YCA (Pro -> Ser)	12: GGT -> GRT (Gly -> Asp)	
Colon-1 LK-TZ3	Mx		12: GGT -> GRT (Gly -> Asp)	
Colon-1 LK-TZ4	Mx		12: GGT -> GRT (Gly -> Asp)	
Colon-1 LK-TZ5	Mx		12: GGT -> GRT (Gly -> Asp)	
Colon-1 TZ-TZ6	Mx		12: GGT -> GRT (Gly -> Asp)	
Colon-1 TZ-TZ7	Mx		12: GGT -> GRT (Gly -> Asp)	
Colon-2 PT1	M0	300: CCC -> YCC (Pro -> Ser) 310: AAG -> AAS (Lys -> Asn)		1790: GAG -> AAG (Glu -> Lys)
Colon-2 PT2	M0			1790: GAG -> AAG (Glu -> Lys)
Colon-2 TZ1	M0			1726: TTA -> TTC (Leu -> Phe) 1791: GAG -> GCG (Glu -> Ala) 1816 del (frameshift)
Colon-2 TZ2	M0	Chromosom 12p-Sequenz 309: CCC -> TCC (Pro -> Ser)		
Colon-2 TZ3	M0			
Colon-3 PT1	M1			3297: CAT -> CGT (His -> Arg)
Colon-3 PT2	M1			3297: CAT -> CGT (His -> Arg)
Colon-3 TZ1	M1			
Colon-4 PT1	M0			
Colon-4 PT2	M0			
Colon-4 TZ1	M0	Chromosom 12p-Sequenz 309: CCC -> TCC (Pro -> Ser)		
Colon-4 LK-TZ1	M0	153: CCC -> CCY (Pro -> Pro) 175: CGC -> CGC (Arg -> His)		
Colon-5 PT1	M0			
Colon-5 PT2	M0			
Colon-5 PT3	M0	271: GAG -> RAG (Gly -> Lys) 273: CGT -> CRT (Arg -> His)		
Colon-5 TZ1	M0			
Colon-5 LK-TZ1	M0			
Colon-5 LK-TZ2	M0		12: GGT -> AGT (Gly -> Ser)	
Colon-5 LK-TZ3	M0			
Colon-5 LK-TZ4	M0			
Colon-5 LK-TZ5	M0	309: CCC -> TCC (Pro -> Ser) 320: AAG -> ARG (Lys -> Arg)		3299: CAT -> TAT (His -> Tyr)

Colon-6 PT1	M0			1790: GAG -> AAG (Glu ->Lys)
Colon-6 PT2	M0			1790: GAG -> AAG (Glu ->Lys)
Colon-6 LK-TZ1	M0			
Colon-6 LK-TZ2	M0			3284: ATG -> GTG (Met->Val)
Colon-7 PT1	M0			
Colon-7 PT2	M0			
Colon-7 TZ1	M0			
Colon-7 LK-TZ1	M0			
Colon-7 LK-TZ2	M0			
Colon-7 LK-TZ3	M0			
Colon-7 LK-TZ4	M0			
Colon-7 LK-TZ5	M0			3269: TAT -> CAT (Tyr ->His)
Colon-7 LK-TZ6	M0			
Colon-8 PT1	M0	273: CGT -> CRT (Arg -> His)		
Colon-8 TZ1	M0			
Colon-9 PT1	M0	304/305: del -1 hom.		
Colon-9 TZ1	M0			
Colon-10 PT1	M1			1792: GAG -> GAC (Glu -> Asp) 1816: AGT -> AGC (Ser -> Ser) 3210: GAC -> GGC (Asp-->Gly)
Colon-10 TZ1	M1			
Colon-10 TZ2	M1			

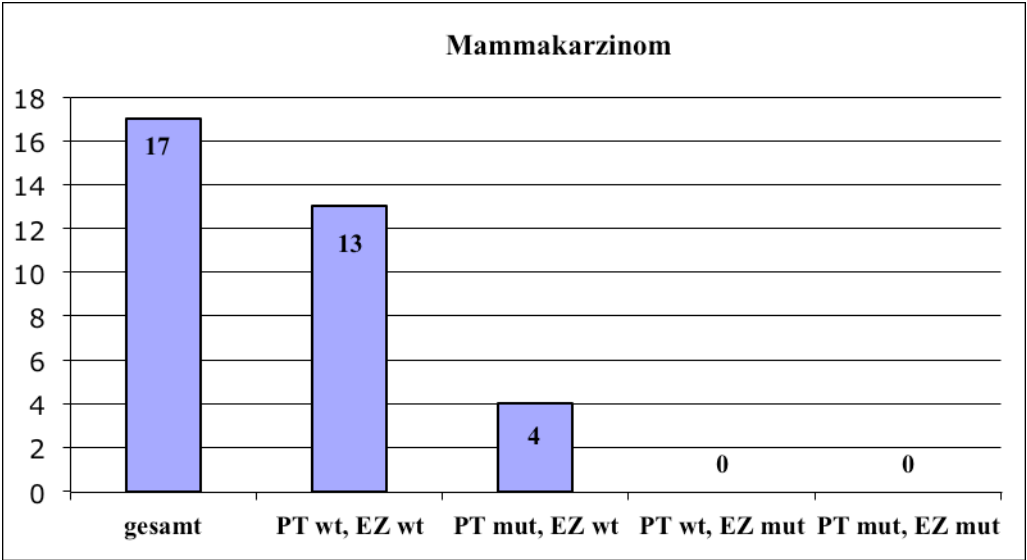
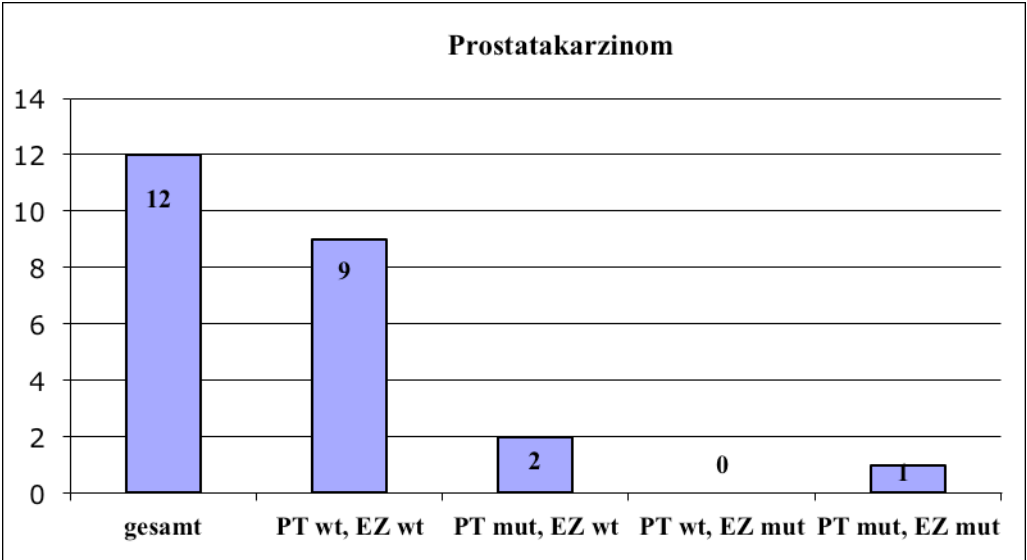
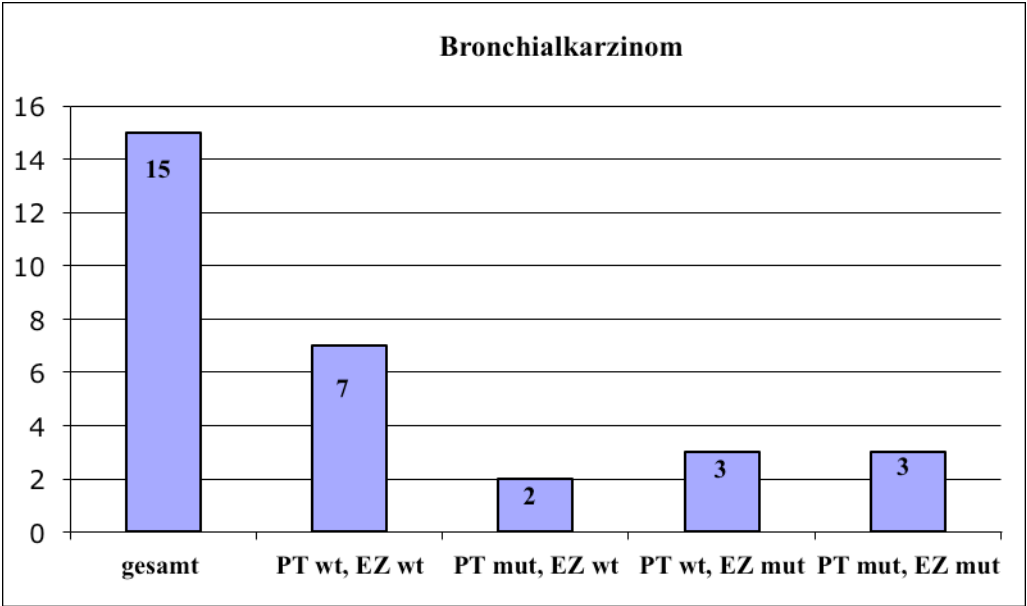
Es zeigt sich, daß sich die *TP53*-Mutationsrate in den unterschiedlichen Tumorentitäten in etwa ähnelt (s. hierzu auch Abb. 11): So hatten

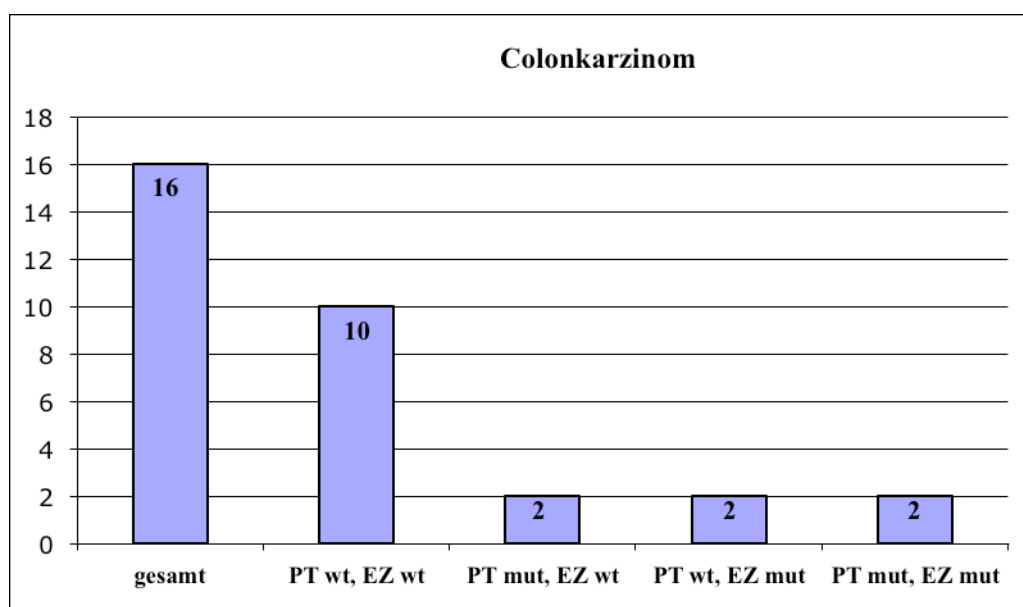
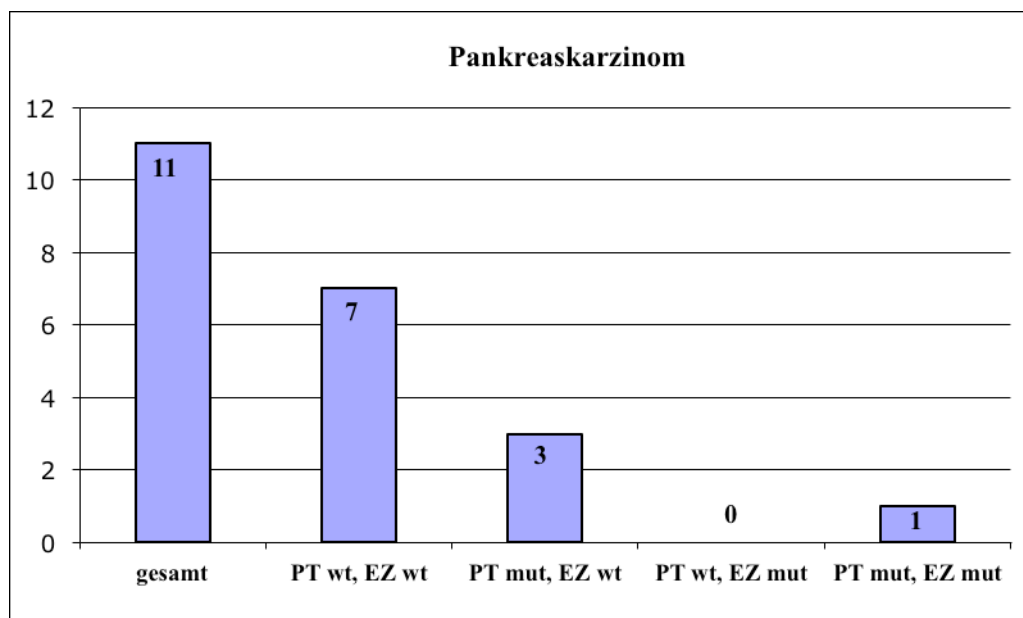
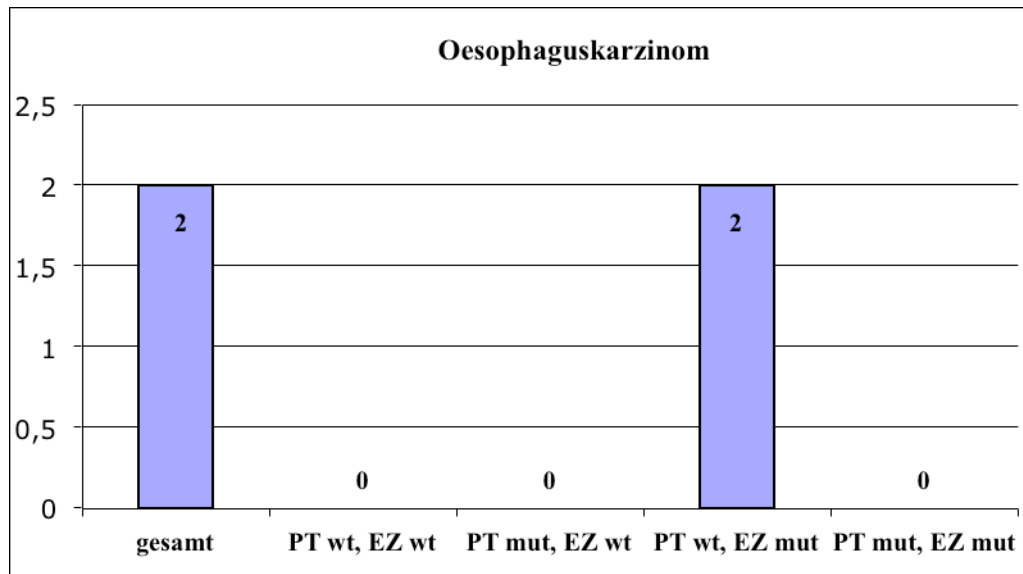
- 2 / 15 Bronchialkarzinomen (13,3%)
- 2 / 12 Prostatakarzinomen (16,7%)
- 4 / 17 Mammakarzinomen (23,5%)
- 0 / 2 Oesophaguskarzinomen (0%)
- 3 / 11 Pankreaskarzinomen (27,3%)
- 2 / 16 Colonkarzinomen (12,5%) eine *TP53*-Mutation im Primärtumor (i. Schnitt: 17,8%).

In 3 / 15 Bronchialkarzinomen (20%)  
 0 / 12 Prostatakarzinomen (0%)  
 0 / 17 Mammakarzinomen (0%)  
 2 / 2 Oesophaguskarzinomen (100%)  
 0 / 11 Pankreaskarzinomen (0%)  
 2 / 16 Colonkarzinomen (12,5%) fand sich eine *TP53*-Mutation in einer oder mehreren Einzelzellen (durchschnittlich 9,6%).

Bei 3 / 15 Bronchialkarzinomen (20%)  
 1 / 12 Prostatakarzinomen (8,3%)  
 0 / 17 Mammakarzinomen (0%)  
 0 / 2 Oesophaguskarzinomen (0%)  
 1 / 11 Pankreaskarzinomen (9,1%)  
 2 / 16 Colonkarzinomen (12,5%) konnte eine *TP53*-Mutation im Primärtumor sowie einer oder mehrerer zugehöriger Einzelzellen gefunden werden (durchschnittlich 9,6%).

Abb. 11: TP53-Mutationsraten nach Tumortyp (Legende s.u.)







*Legende Abbildung 11: Häufigkeiten einer TP53-Mutation nach Tumortyp.*

*Die einzelnen Balken geben jeweils das Vorhandensein einer TP53-Mutation in einer oder mehreren Primärtumoren (PT) und / oder Einzelzellen (EZ) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Einzelzell- und Primärtumorkomplexe an: wt = Wildtyp, mut = Mutation*

Die Detektion einer TP53-Mutation scheint im untersuchten Kollektiv allenfalls tendenziell vom Metastasierungsstatus abhängig zu sein: Bei drei Tumorentitäten waren auch Tumoren im metastasierten Tumorstadium zur Untersuchung gekommen.

Von zwölf Prostatakarzinomen war für fünf ein biochemisches Rezidiv (M0/BR) ohne bislang manifeste Metastasierung beschrieben (41,7%), zwei Tumoren hatten nachgewiesene Metastasen (16,7%). Eine TP53-Mutation im Primärtumor konnte bei je einem Patienten des Tumorstadiums M0, M0/BR sowie M1 gefunden werden, wobei in letzterem auch disseminierte Zellen detektiert wurden.

Von den siebzehn untersuchten Mammakarzinomen waren fünf im Stadium M1 (29,4%). Zwei TP53-Mutationen im Primärtumor fanden sich im M0-Stadium, zwei weitere im M1-Stadium, jeweils ohne Nachweis disseminierter Zellen.

Unter sechzehn Colonkarzinomen hatten vier eine manifeste Metastasierung (25%). Unter diesen konnte weder eine TP53-Mutation im Primärtumor noch in disseminierten Zellen gefunden werden.

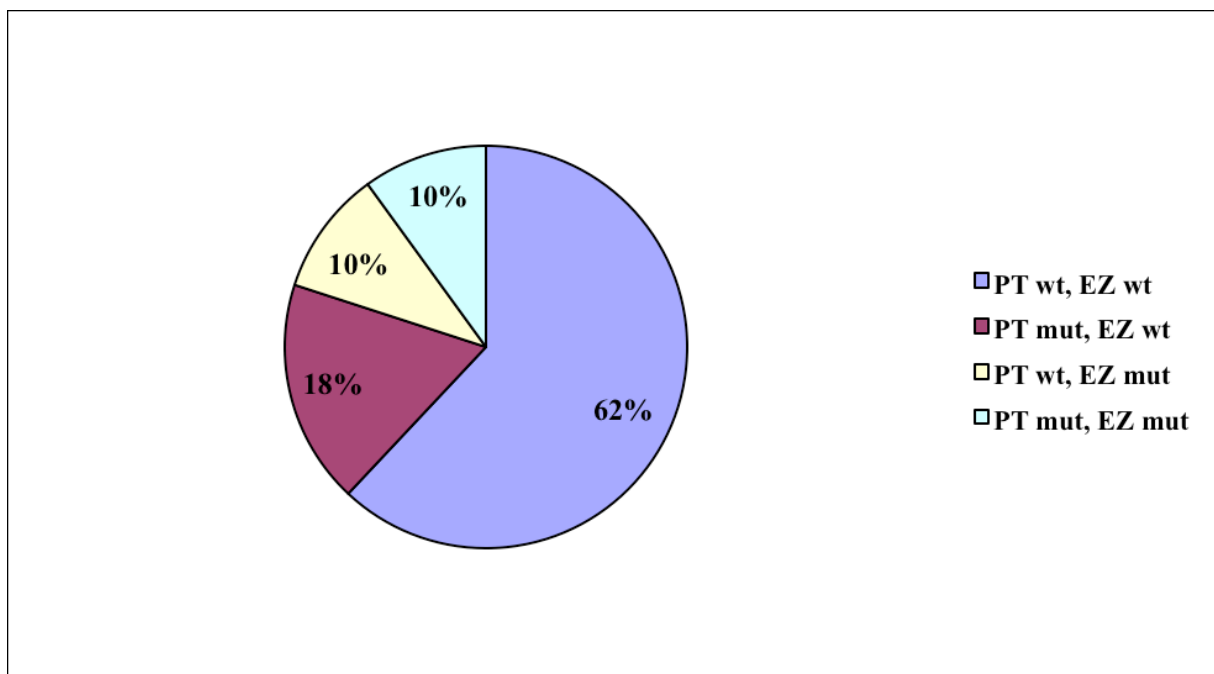
Bei 26 Primärtumor-Einzelzellpaaren konnten mehrere Einzelzellen untersucht werden. Davon wiesen sechs Paare in zwei oder mehr Zellen eine TP53-Mutation auf (BC-3 TZ1 & TZ2; BC-4 TZ2, TZ3 & TZ4; PC-2 TZ2 & TZ3; OeCa-2 TZ2, TZ3 & TZ3; Panc-6 LK-TZ1, LK-TZ2 & LK-TZ3 sowie Colon-4 TZ1 & LK-TZ1). Bei fünf Paaren ließ sich lediglich eine Mutation in einer Einzelzelle finden (BC-5 TZ2, OeCa-1 TZ1, Colon-1 LK-TZ2, Colon-2 TZ2 sowie Colon-5 LK-TZ5) während bei acht Paaren nur eine TP53-Mutation im Primärtumor nachgewiesen werden konnte (BC-6, BC-8, PC-1, PC-3, MaCa-2, MaCa-3, MaCa-4 sowie Panc-5). Bei den restlichen drei Einzelzellen mit TP53-Mutation (BC-1 TZ1, BC-2 TZ1 sowie BZ-7 TZ1) war keine weitere zytokeratin-positive Zelle im Knochenmark gefunden worden.

Erwähnenswert bei den sechs Paaren mit mehreren TP53-mutierten Zellen scheint, daß die Mutationen in fünf der Fälle sich in den Tumorzellen aus den Knochenmark annähernd gleichen, nur zweimal aber die Mutation im Primärtumor auch in den disseminierten Zellen wiedergefunden werden kann:

<u>BC-3:</u>	PT: cd. 273 CGT -> CRT	TZ1 & 2: 298 GAG -> TAG	M0
<u>BC-4:</u>	PT: cd. 215 AGT -> GGT	TZ2, 3 & 4: 215 AGT -> GGT	M0
<u>PC-2:</u>	PT: cd. 259 GAC -> KMC	TZ2 & 3: cd. 136 CAA -> TAA	M1
<u>OeCa-2:</u>	PT: keine Mut.	TZ2, 3 & 4: cd. 175 CGC -> CAC (2 x hom.)	M0
		TZ2: cd. 292 del -1 (het.)	
<u>Panc-6:</u>	PT: cd. 274 del -1 (het.)	LK-TZ1, 2 & 3: cd. 274 del -1 (2 x hom.)	M0
	cd. 275 TGT -> TKT		
<u>Colon-4:</u>	PT: keine Mut.	TZ1: cd. 309. CCT -> TTC	M0
		LK-TZ1: cd. 153 CCC -> CCY	

Diese tendenzielle Klonalität der Einzelzellen in BC-3, BC-4, PC-2, OeCa-2 sowie Panc-6 ist in Zellen aus dem gleichen Kompartiment zu beobachten, so haben die Zellen entweder ihren Ursprung entweder im Knochenmark oder in einem Lymphknoten. Im Falle von Colon-6 gehen die unterschiedlichen Mutationen der Einzelzellen mit einer unterschiedlichen Herkunft der Zellen einher. Einschränkend gilt weiterhin, daß im Falle von OeCa-2 zwar bei zwei disseminierten Zellen eine homozygote Mutation des in der dritten Zelle heterozygot mutierten Codons 175 nachgewiesen wurde, gleichzeitig aber noch eine der Zellen eine Mutation im Codon 292 trägt, die die beiden anderen disseminierten Tumorzellen nicht teilen.

**Abb. 15: TP53-Mutationsraten sämtlicher Einzelzell-Primärtumorpaaire** (Legende s.u.)



*Legende Abb. 15: Häufigkeiten einer TP53-Mutation über sämtliche Tumortypen gemittelt. Die einzelnen Balken geben jeweils das Vorhandensein einer PIK3CA-Mutation in einer oder mehreren Primärtumoren (PT) und / oder Einzelzellen (EZ) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Einzelzell-und Primärtumorpaaire an: wt = Wildtyp, mut = Mutation*

Neben der in Abb. 15 noch einmal für sämtliche Tumorentitäten zusammengefaßten *TP53*-Mutationsrate gibt Tabelle 13a einen Überblick über die geringe Frequenz von *TP53*-Mutationen auf Einzelzellebene sowie das Überwiegen von als homozygot gewerteten Mutationen (BC = Bronchialkarzinom, PC = Prostatakarzinom, MaCa = Mammakarzinom, OeCa = Oesophaguskarzinom, Panc = Pankreaskarzinom und Colon = Colonkarzinom):

**Tabelle 13a: *TP53*-Mutationen auf Einzelzellebene**

	BC	PC	MaCa	OeCa	Panc	Colon	Σ
<b>analysierte Einzelzellen</b>	44	27	66	6	29	41	213
<b>davon heterozyg. <i>TP53</i>-Mut.</b>	2 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (50%)	1 (3%)	3 (7%)	9 (4%)
<b>davon homozyg. <i>TP53</i>-Mut.</b>	9 (20%)	2 (7%)	0 (0%)	2 (33%)	2 (7%)	4 (10%)	19 (9%)
<b>Σ <i>TP53</i>-Mutationen</b>	11 (25%)	2 (7%)	0 (0%)	5 (83%)	3 (10%)	7 (17%)	28 (13%)

Um näher zu beleuchten, ob bei einer homozygoten Mutation der Verlust des zweiten Allels auch tatsächlich stattgefunden hat, oder ob dieser anzunehmende Verlust eher ein Artefakt darstellt, wurde versucht, die Qualität der Signale anhand des Ausfalls der Mse-I-Fragmente näherungsweise zu bestimmen: Hierbei wurde die Anzahl der in der PCR nicht amplifizierten Mse-I-Fragmente von mutationstragenden Einzelzellen in Verhältnis zur Heterozygotie / Homozygotie der Veränderung gesetzt.

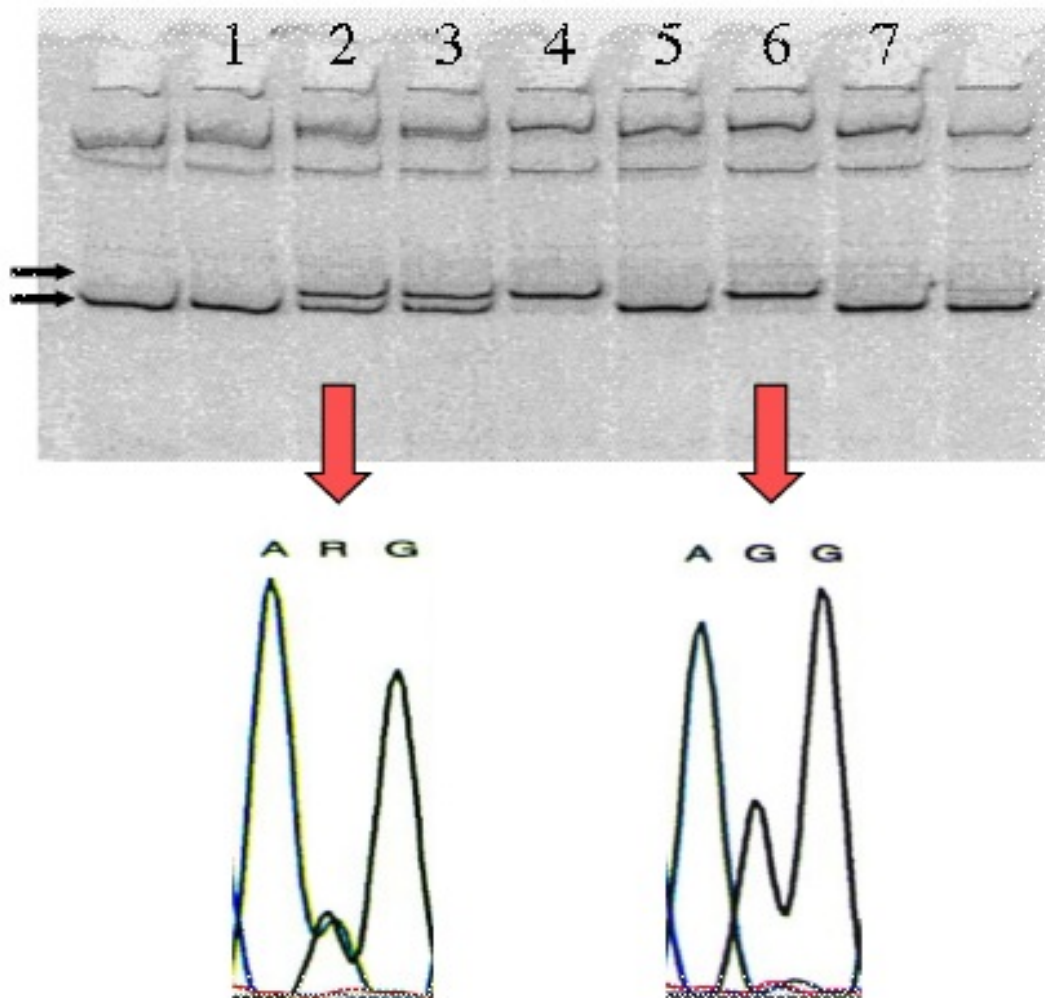
Bei 14 homozygoten *TP53*-Mutationen kam es einmal zu einem Ausfall von einem sowie dreimal zu einem Ausfall von drei der fünf Mse-I-Fragmente ( $4/14 = 28,6\%$ ), auf denen die untersuchten *TP53*-Exons liegen. Bei den fünf heterozygoten *TP53*-Mutationen kam es zu keinem Mse-I-Fragment-Ausfall. Bei vier Einzelzellen wurden mehrere *TP53*-Mutationen in einer Zelle gefunden, wo jeweils eine homozygote und eine heterozygote Mutation vorlag - hier war bei einer Zelle ein Verlust eines Mse-I-Fragments zu beobachten ( $1/4 = 25\%$ ) (s. Tab. 15 im Anhang). Dem Nachweis einer homozygoten Mutation in einer Einzelzelle wohnt also durchaus ein gewisser Verdacht eines Artefakts inne, wobei in der Mehrzahl der gefundenen Mutationen kein Unterschied in der PCR-Signalqualität in Form von Mse-I-Fragmentverlusten festgestellt werden konnte.

Betrachtet man die Verteilung der *TP53*-Mutationen in Primärtumor und Einzelzelle, so zeigt sich erneut, daß im Falle der Detektion mehrerer Einzelzellen die Mutation häufiger innerhalb der Einzelzellen geteilt wird als daß diese Mutation gleichzeitig im Primärtumor und den jeweiligen Einzelzellen vorhanden ist. (s. Tab. 13b).

**Tabelle 13b: Patienten mit *TP53*-Mutationen auf Einzelzellebene**

	<b>BC</b>	<b>PC</b>	<b>MaCa</b>	<b>OeCa</b>	<b>Panc</b>	<b>Colon</b>	<b>Σ</b>
<b>Patienten mit einer Einzelzelle</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>8</b>
davon: geteilte <i>TP53</i> -Mut. in PT u. Einzelzellen	1						1
<b>Patienten m. mehr als einer EZ</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>6</b>
davon: geteilte <i>TP53</i> -Mut. in Einzelzellen	1	1		1			3
davon: geteilte <i>TP53</i> -Mut. in PT u. Einzelzellen	1				1		2

Die bereits in der Erläuterung der Ergebnisse angesprochene Heterogenität der Mutationen ist also mit großer Wahrscheinlichkeit zusammenfassend nicht ausschließlich als artifizuell zu bewerten, wovon die nachfolgende Abbildung 12 einen Eindruck gibt:



**Abb. 12: TP53-Exon-5-SSCP und Sequenzierung**

Fünf CK<sup>+</sup>-Zellen einer Mammakarzinompatientin im Stadium M1 (ohne verfügbaren Primärtumor) wurden analysiert (oberer Pfeil: Wildtyp-Allel, unterer Pfeil: mutiertes Allel):

Spur 1: Kontrollzelle (eines anderen Patienten)

Spur 2: Tumorzelle 1 - 132: AAG -> ARG (Lys-> Arg), heterozyg. Mut. mit AS-Austausch

Spur 3: Tumorzelle 2 - 132: AAG -> ARG (Lys-> Arg), heterozyg. Mut. mit AS-Austausch

Spur 4: Tumorzelle 3 - 132: AAG -> AGG (Lys-> Arg), homozyg. Mut. mit AS-Austausch

Spur 5: Tumorzelle 4 - 132: AAG (Wildtyp), aber zwei heterozygote Mutationen im Exon 6:  
200/201: del -1 sowie 202 CGT -> YGT (Arg -> Cys)

Spur 6: Tumorzelle 5 - 132: AAG -> AGG (Lys-> Arg), homozyg. Mut. mit AS-Austausch

Spur 7: Kontrollzelle (eines anderen Patienten)

### 3.4 KRAS

Analog zur *TP53*-Analyse wurden auch für die *KRAS*-SSCP nur Zellen ausgewählt, bei denen auch ein Primärtumor untersucht werden konnte. Ein Nachweis einer *KRAS*-Mutation im Exon 2, in dessen Codons 12 and 13 95% aller Mutationen liegen, ließ sich erbringen bei

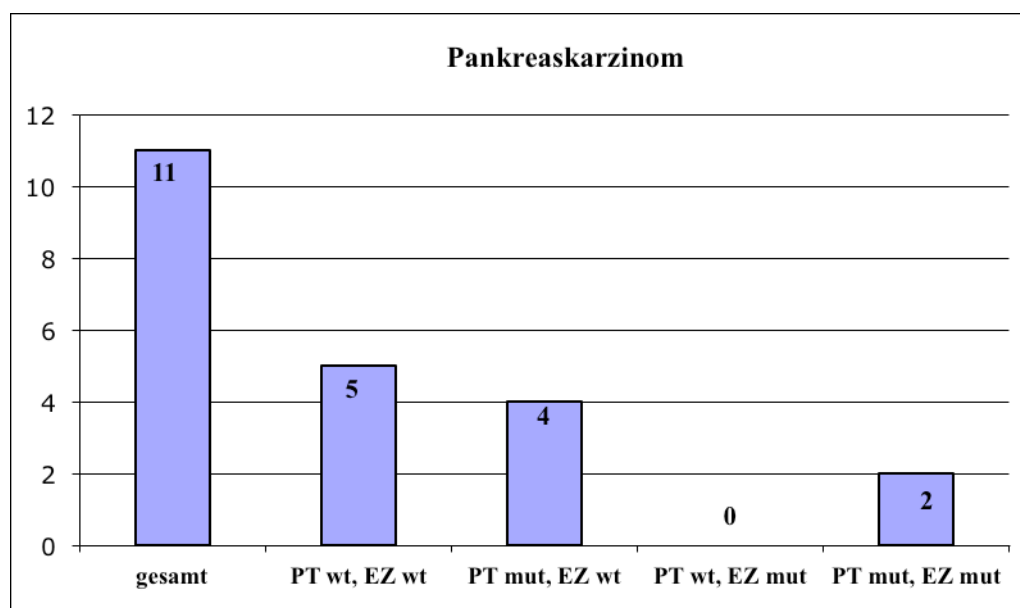
6 / 11 Pankreaskarzinomen

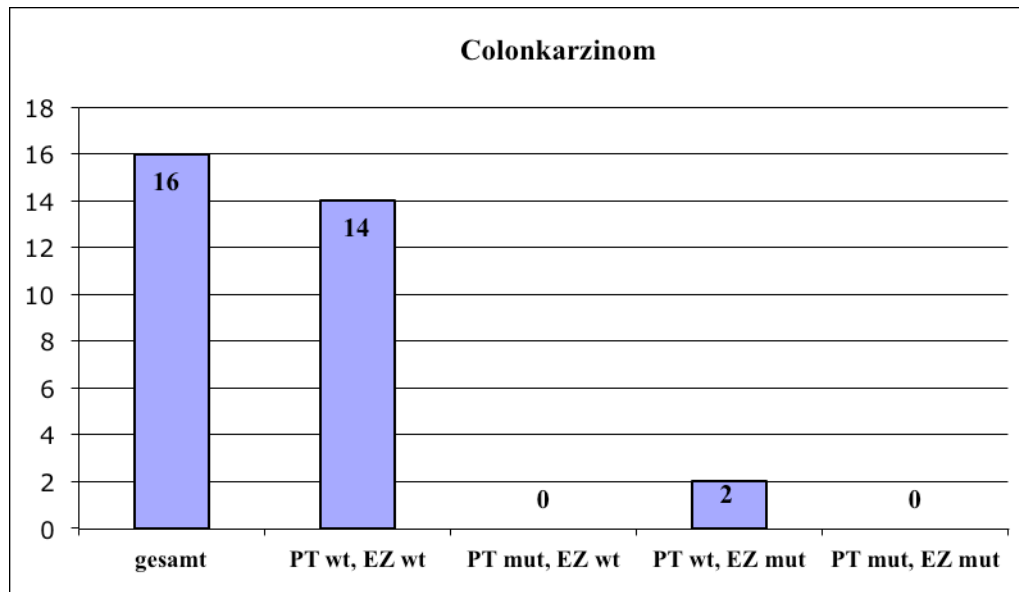
2 / 16 Colonkarzinomen

Bei 6 von 11 (54,5%) Pankreaskarzinomen ließ sich eine *KRAS*-Mutation finden (s. Tabelle 12 im vorherigen Kapitel über *TP53*), wiederum häufiger in den Primärtumoren (Panc-2, Panc-3, Panc-4 sowie Panc-8). In zwei Fällen (Panc-1, Panc-6) wiesen Primärtumor und zugehörige Einzelzelle die selbe Mutation auf. Diese Ergebnisse sind insofern interessant, als *KRAS*-Mutationen ein sehr frühes Ereignis in der Entstehung von Pankreastumoren sind und deswegen eine wesentlich höhere Frequenz zu erwarten gewesen wäre (Almoguera, 1988).

Bei 2 von 16 Colonkarzinomen (12,5%) wurden *KRAS*-Alterationen nachgewiesen, ausschließlich in Einzelzellen (Colon-1, Colon-5), während in Primärtumoren kein Nachweis einer *KRAS2*-Mutation gelang. Hier fällt auf, daß im Fall von Colon-1 sämtliche Tumorzellen bis auf eine dieselbe Mutation teilen, wohingegen bei Colon-5 nur eine von sechs disseminierten Zellen eine *KRAS*-Mutation trägt.

**Abb. 13: *KRAS*-Mutationsraten nach Tumortyp (Legende s.u.)**





Legende Abbildung 13: Häufigkeiten einer KRAS-Mutation nach Tumortyp.

Die einzelnen Balken geben jeweils das Vorhandensein einer KRAS2-Mutation in einer oder mehreren Primärtumoren (PT) und / oder Einzelzellen (EZ) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Einzelzell- und Primärtumoraare an: wt = Wildtyp, mut = Mutation

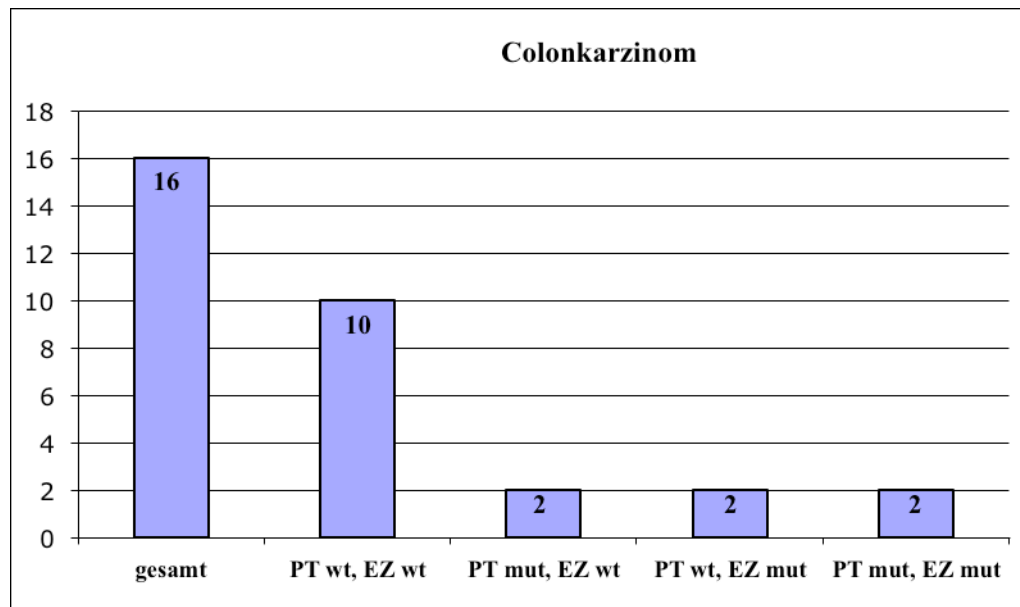
### 3.5 PIK3CA

Die Einzelzell-Primärtumoraare der Colonkarzinome wurden schließlich mittels Direktsequenzierung auf Mutationen im *PIK3CA*-Gen untersucht. Sequenziert wurden der hotspot im Exon 9 (HS1) sowie der hotspot im Exon 20 (HS2).

Diese Arbeit wurde von Sandra Grunewald am Lehrstuhl für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren der Universität Regensburg, Leitung: Prof. Dr. med. Ch. Klein, durchgeführt.

Bei 6 von 16 Colonkarzinomen (37,5%) wurden *PIK3CA*-Mutationen nachgewiesen, jeweils zwei in Primärtumor-Einzelzellpaaren (Colon-2, Colon-6), zwei nur im Primärtumor (Colon-3, Colon-10) und zwei in der Gruppe der Einzelzellen (Colon-5, Colon-7). Auch hier gab es, wie schon in der Mehrzahl der *TP53*-Analysen, keine Übereinstimmung im Sinne einer Klonalität bei den Mutationen in den Primärtumor-Einzelzellpaaren.

Interessant ist trotz der mit 16 Primärtumor-Einzelzellpaaren geringen Zahl untersuchter Patienten mit Colonkarzinom weiterhin, daß in keiner Probe eine gleichzeitige Mutation von *PIK3CA* und *KRAS* gefunden werden konnte (s. Tab. 12f im Kapitel „*TP53*“) - entgegen der Beschreibung eines vorzugsweise gemeinsamen Auftretens dieser Mutationen (Velho *et al.*, 2005).

**Abb. 14: *PIK3CA*-Mutationsraten** (Legende s.u.)

Legende Abbildung 14: Häufigkeiten einer *PIK3CA*-Mutation nach Tumortyp.

Die einzelnen Balken geben jeweils das Vorhandensein einer *PIK3CA*-Mutation in einer oder mehreren Primärtumoren (PT) und / oder Einzelzellen (EZ) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Einzelzell- und Primärtumorpaaare an: wt = Wildtyp, mut = Mutation

Bei aller Vorsicht der Interpretation der Primärtumordaten aufgrund des unter 3.1.2 dargestellten ausgeprägten artifiziellen Signalverlusts ist auch hier wieder zu bemerken, daß in den Primärtumor-Einzelzellpaaren (Colon-2, Colon-6), die eine *PIK3CA*-Mutation sowohl im Primärtumor wie auch in der / den disseminierten Einzelzelle/n tragen, jeweils eine andere Mutation im Primärtumor und in den disseminierten Zellen nachgewiesen wird: So wird in beiden Primärtumorearealen von Colon-2 eine Mutation im Codon 1790 gefunden, während nur eine der drei Einzelzellen mutiert ist, dafür aber auch in den drei Codons 1726, 1791 und 1816. Im Falle von Colon-6 liegt die identische Mutation im Codon 1790 vor wie in Colon-2, die eine der beiden Einzelzellen trägt aber erneut eine hiervon unterschiedliche Mutation im Codon 3284.



## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Frage gestellt, ob sich in den Genen *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA* Mutationen in einzelnen disseminierten Tumorzellen nachweisen lassen. Ebenso sollte geklärt werden, welchen Mutationsstatus diese Gene in Zellen des Primärtumors haben. Hierfür wurden die Exons 4-9 des *TP53*-Gens, die 95% aller bekannten *TP53*-Mutationen beinhalten, sowie die Codons 12 und 13 des Exons 2 des *KRAS*-Gens, innerhalb derer sich nahezu sämtliche *KRAS*-Mutationen finden lassen (Bos, 1989), mit Hilfe der SSCP auf Punktmutationen analysiert. Die hotspots des *PIK3CA*-Gens in den Exons 9 und 20 wurden direkt sequenziert.

### 4.1 Methodische Gesichtspunkte

Zunächst wurde zu Beginn der Arbeit die Verlässlichkeit der Methode der Genamplifikation aus einzelnen cytokeratin-negativen Zellen, die nach der gleichen Methode wie die im folgenden untersuchten disseminierten Tumorzellen (DTC) isoliert und aufgearbeitet wurden, näher betrachtet. Hierbei zeigte sich, daß in Abhängigkeit der Größe des zu amplifizierenden Mse-I-Fragments bei etwa 5-10% der Normalzellen eine potentielle Änderung der DNA-Sequenz aufgrund des Signalverlustes nicht bemerkt werden würde.

Der mit 10-25% dagegen erhöhte Signalverlust bei disseminierten Tumorzellen kann außer rein methodisch zu einen Teil sicher auch mit einem tumorbedingten Allelverlust erklärt werden, da gerade bei Tumorsuppressorgenen wie *TP53* der Verlust des Wildtyp-Allels in Folge der Punktmutation des anderen Allels ein häufiges, wenngleich nicht zwangsläufiges Geschehen ist (Knudson, 1971). Im Fall von *TP53* ist zusätzlich ein dominant-negativer Effekt beschrieben, bei dem das mutierte p53 durch Tetramerisierung das verbliebene Wildtyp-p53 hemmt und so dessen tumorsuppressive Funktion vermindert (Milner *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 2004).

Der methodenbedingte Signalverlust war bei den Primärtumoren noch deutlicher. Während kryokonserviertes Gewebe, das nach dem Mse-I-Adapterprotokoll bearbeitet wurde, überhaupt keine Signalverluste zeigte, führte eine gleichzeitige Isolation von mRNA und DNA hier bereits zu einem Signalverlust von ca. 12-16% in Abhängigkeit von der Mse-I-Fragmentgröße. Bei der DNA-Isolation aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe schließlich stieg der Signalverlust von 9,3% im Mse-I-Fragment von 192 bp über 27,1% im Mse-I-Fragment von 558 bp auf 53%, 60,8% sowie 77,1% in den größeren Mse-I-Fragmenten von 722 bp, 1032 bp und 1374 bp. Bei Mse-I-Fragmenten von über 500 bp erscheint eine sinnvolle Mutationssuche daher nicht mehr möglich.

Neben dem Verlust der genetischen Information an sich ist es aber gerade für ein Gen wie *TP53* wichtig feststellen zu können, daß ein Allelverlust kein Amplifikationsartefakt darstellt.

Denn gerade hier ist eine hohe Rate an Verlusten des Wildtypallels (loss of heterozygosity [LOH]) beschrieben, wenn eine Punktmutation eines Allels aufgetreten ist (van Boxtel *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wurden mit dem Codon-72-Polymorphismus im *TP53*-Gen, einer Punktmutation im Exon 6 des *TP53*-Gens sowie einer Punktmutation im *KRAS*-Gen heterozygote Mutationen oder Polymorphismen herangezogen, die auf Einzelzellebene mittels der SSCP untersucht wurden, um artifizielle Verluste quantifizieren zu können. Im Mittel ergab sich hierbei ein artifizieller Allelverlust von 20% bei diploiden Einzellzellen. Die Untersuchung des *TP53*-Codon-72-Polymorphismus in J82-Einzelzellen erbrachte einen mit 50% deutlich höheren Allelverlust, so daß Zweifel an der in der Literatur angegebenen weitgehenden Triploidie (inklusive Trisomie 17) der Zelllinie (O'Toole *et al.*, 1978) angebracht sind. Die Daten diploider Zellen decken sich aber in etwa mit der von Julian Schardt in seiner Dissertation beschriebenen durchschnittlichen Wahrscheinlichkeit eines artifiziellen Allelverlusts von 16%.

Dennoch liegt die natürliche Rate an tumorbedingten Allelverlusten im *TP53*-Gen deutlich höher: So wird in der Literatur eine LOH-Rate von 48-60% angegeben (Tamada *et al.*, 1994; Gonzales-Aguilera *et al.*, 1999; Dearth *et al.*, 2007; Rohini *et al.*, 2007). Diese Rate konnte bei der Analyse von DTCs zwar nicht gefunden werden, zeigte sich aber zumindest tendenziell: Schlüsselte man die *TP53*-Mutationen bei disseminierten Tumorzellen nach homo- und heterozygoter Mutation auf, fällt auf, daß es in 25-28,6% der eine homozygote Mutation tragenden disseminierten Tumorzellen zu Verlusten von Mse-I-Fragmenten gekommen war. Da bei einem LOH nur noch ein Allel als Ausgangsmaterial für die Mse-I-PCR vorliegt, könnte ein Verlust von Mse-I-Fragmenten tatsächlich Ausdruck einer erschwerten Amplifikation infolge eines Allelverlust sein. Auf der anderen Seite ist aber auch möglich, daß bei Einzelzellen mit schlechter DNA-Qualität eine falsch-positive Überdetektion von homozygoten im Vergleich zu heterozygoten Mutationen erfolgen könnte.

An diploiden Normalzellen wurde schließlich noch die Rate des PCR-bedingten Fehlers bestimmt. In 1/19 Fällen wurde eine heterozygote Deletion einer Base gefunden. Anhand der Relation sämtlicher amplifizierter Basen und der einen fehlerhaften Base wurde eine Fehlerrate von  $1,4 \times 10^{-5}$  ermittelt, was sich in etwa mit der laut Hersteller zu erwartenden Fehlerrate des PCR Systems von  $1,5 \times 10^{-5}$  deckt.

Schließlich konnte das Detektionssystem der SSCP 20 von 21 *TP53*-Mutationen erkennen und wies damit eine Sensitivität von 95% auf. Sämtliche mögliche *KRAS*-Mutationen im Codon 12 wurden durch die SSCP entdeckt.

Zusammenfassend sind die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten deswegen als verlässlich zu werten: Die Zahl der falsch-positiven Mutationen erscheint vernachlässigbar. Ein artifizieller Signalverlust eines Mse-I-Fragments tritt in 5-10% auf, die Wahrscheinlichkeit eines positiven PCR-Signals in einer Tumorzelle liegt zwischen 75-90%.

Bei der hohen Signalverlustrate bei der DNA-Isolation von Primärtumoren aus formalinfixiertem und paraffineingebetteten Gewebe sind lediglich genomweite Aberrationsanalysen wie die Metaphasen-CGH möglich, da hier eine Auflösung von lediglich 10-20 Mb erreicht wird, und Verluste einzelner Mse-Fragmente nicht ins Gewicht fallen (Stoecklein et al., 2002). Für die Analyse von genspezifischen Punktmutationen können in dieser Arbeit nur die Daten des Bronchial- und Prostatakarzinompatientenkollektivs herangezogen werden. Diese Ergebnisse beruhen auf der DNA-Isolation aus Kryogewebsschnitten, bei der Verlustraten von 0-16% (Prostatakarzinom 0%, Bronchialkarzinom 16%) beobachtet wurden. Diese Proben können somit für Vergleiche mit den disseminierten Tumorzellen herangezogen werden.

## 4.2 *TP53*-, *KRAS*- und *PIK3CA*-Mutationen in disseminierten Tumorzellen

### Mutationsfrequenz

Generell liegt die Rate an *TP53*-, *PIK3CA*-, insbesondere aber *KRAS*-Mutationen in disseminierten Tumorzellen deutlich unter den Erwartungen des betreffenden Tumortyps.

So wiesen nur vier von 41 disseminierten Colonkarzinomzellen eine *PIK3CA*-Mutation auf. Die Häufigkeit von *PIK3CA*-Mutationen bei Primärtumoren wird mit 32% angegeben (Samuels et al., 2004).

Bei der *TP53*-Analyse konnte lediglich in 28 von 213 analysierten DTCs (13%) eine Mutation gefunden werden. Diese Mutationsrate war über die Tumorentitäten in etwa gleichmäßig verteilt. Dabei fiel lediglich auf, daß beim Mammakarzinom keine *TP53*-Mutation beobachtet wurde und beim Oesophaguskarzinom in den beiden untersuchten Patienten 83% der Zellen eine Mutation aufwiesen. Dennoch gilt für die global mit 50% zu veranschlagende *TP53*-Mutationsrate, daß die Häufigkeiten von *TP53*-Veränderungen in disseminierten Tumorzellen deutlich unter der Erwartung der aus Primärtumoren generierten Daten liegen.

Eine *KRAS*-Mutationstate von um die 50% würde für das Colonkarzinom erwartet, beim Pankreaskarzinom sollte nahezu jede Tumorzelle eine *KRAS*-Mutation tragen. Auch unter der Voraussetzung, daß beim *KRAS*-tragenden Mse-I-Fragment mit einer Länge von 192 bp - im Gegensatz zu einer verlustfreien Abbildung des Einzelzellgenoms von Normalzellen - ein 10%iger Signalverlust bei disseminierten Tumorzellen gefunden wurde (s. Abb. 7), liegt die äußerst geringe Frequenz von sieben *KRAS*-Mutationen von 41 untersuchten Colonkarzinom-Einzelzellen (17%) bzw. vier von 29 Pankreaskarzinom-Einzelzellen (14%) weit unterhalb dieser zu erwartenden Mutationsrate.

Die Annahme, daß die eine oder andere cytokeratin-positive Zelle keine Tumorzelle war, konnte ausgeschlossen werden, da die analysierten disseminierten Tumorzellen in der CGH

Analyse klare chromosomale Veränderungen aufwiesen.

### **Heterogenität der gefundenen Mutationen**

Bei sechs Patienten konnte in mehreren disseminierten Tumorzellen eine *TP53*-Mutation gefunden werden. Zwar gleichen sich die Mutationen in fünf der Fälle in den Tumorzellen aus den Knochenmark annähernd, zweimal kann die Mutation des Primärtumors auch in den disseminierten Zellen wiedergefunden werden. Dabei stellt sich bei näherer Betrachtung eine auffallende Heterogenität innerhalb mehrerer Einzelzellen eines Patienten dar: Hierbei wird in der Hälfte der Fälle eine homozygote Mutation eines Codons in der einen und eine heterozygote Mutation des selben Codons in einer anderen Zelle gefunden, oder es tritt eine weitere Mutation in einer anderen Zelle hinzu.

Lediglich für das *KRAS*-Gen als frühester Mutation im Pankreaskarzinom ist eine angedeutete Klonalität darstellbar: Bei zwei Patienten tritt die Mutation in Primärtumor und Einzelzelle gemeinsam auf, bei einem dieser Patienten teilen sich hierbei alle drei disseminierten Tumorzellen die gleiche Mutation, was aber angesichts der nahezu exklusiven Häufung der *KRAS*-Mutationen im Codon 12 auch nicht sehr verwundern kann.

### **4.3 Vergleich mit den Primärtumoren**

Bei der *TP53*-Analyse konnten von den 73 Einzelzell-Primärtumoraaren nur bei 27 Patienten eine Mutation entweder nur in einer (oder mehreren) Einzelzelle(n) (7x = 9,6%), nur im Primärtumor (13x = 17,8%) oder sowohl in Einzelzellen wie auch im dazugehörigen Primärtumor (7x = 9,6%) gefunden werden.

Neben der geringen Frequenz der untersuchten Mutationen in disseminierten Tumorzellen fiel für das *TP53*-Gen auf, daß in vier von sieben Einzelzell-Primärtumoraaren mit einer Mutation sowohl im Primärtumor wie auch in der Einzelzelle (BC3, PC-2, Colon-2 sowie Colon-5) die Mutation des Primärtumors nicht von der / den Einzelzelle(n) geteilt wurde. In drei Fällen (BC-2, BC-4 sowie Panc-6) bestand dagegen ein sehr ähnliches *TP53*-Mutationsmuster. Ein klarer Zusammenhang zum M0/M1-Stadium der Patienten ließ sich hierbei nicht erkennen. Die für die im Colonkarzinom als zeitgleich mit der *TP53*-Mutation am Übergang vom späten Adenom zum Karzinom postulierte Alteration im *PIK3CA*-Gen (Jones *et al.*, 2008) ließ ebenfalls keinerlei Gemeinsamkeiten zwischen disseminierter Tumorzelle und Primärtumor erkennen.

Aufgrund des oben beschriebenen ausgeprägten Signalverlusts der Primärtumoren ist für *TP53* leider nur in wenigen Fällen ein Vergleich der DTC mit den Primärtumoren möglich: Bei den Bronchialkarzinomen zeigen 5/15 der Primärtumoren eine *TP53*-Mutation, was etwas unter der in der Literatur angegebenen Mutationsfrequenz von ca. 50% liegt (Takahashi *et al.*, 1991: 45%; Shipman *et al.*, 1996: 38%; Wistuba *et al.*, 2001: mehr als 50%). Hierbei wird aber nur in zwei Fällen die Mutation von Primärtumor und Einzelzelle/n geteilt. In drei Fällen

läßt sich die Mutation des Primärtumors in den disseminierten Tumorzellen nicht finden, während wiederum drei dissemierte Tumorzellen eine Mutation aufweisen, die im Primärtumor nicht gefunden wurde.

Bei den aufgrund einer geringen Signalverlustrate im Primärtumor ebenfalls noch gut beurteilbaren Prostatakarzinomen werden drei *TP53*-Alterationen im Primärtumor unter zwölf untersuchten Einzellzell-Primärtumorpaaren gefunden, dies entspricht einer *TP53*-Mutationsrate von 25%. Laut Literatur wäre eine Rate von 30-40% zu erwarten (Dong, 2006; Gumerlock *et al.*, 1997; Schlechte *et al.*, 1998). Bei einem Patienten zeigt sich in zwei von sechs disseminierten Einzelzellen eine identische Mutation im Codon 136; im Primärtumor ist diese Mutation allerdings nicht zu finden, dafür tritt eine Mutation im Codon 259 auf (PC-2).

Der Vergleich mit den Primärtumoren ist im Fall von *KRAS* aufgrund des nur geringen Signalverlusts (überhaupt kein Verlust beim Pankreaskarzinom, 16% beim Colonkarzinom) gut möglich. Warum dennoch lediglich in vier von elf Pankreas-Primärtumoren eine *KRAS*-Mutation nachgewiesen werden konnte - und dieser Nachweis beim Colonkarzinom (n=16) vollständig mißlang - könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, daß trotz Probengewinnung durch Laser-Mikrodissektion eine Kontamination mit Normalgewebe des umliegenden Stromas und damit Verdrängung des Signals des Tumorgewebes vorliegt. Ob Intra-Tumor-Heterogenität die geringe Detektionsrate erklären kann, ist fraglich, da eine *KRAS*-Mutation in hoher Frequenz bereits in den Krebsvorstufen vorkommt und darum auch in sämtlichen Tumorzellen vorhanden sein sollte.

Das Mse-I-Fragment, das das *KRAS*-codon 12/13 einschließt, konnte auf Einzellzelebene lediglich in 10% der Fälle methodisch bedingt nicht erfaßt werden. Daher ist die äußerst geringe Frequenz von *KRAS*-Mutationen in disseminierten Pankreaskarzinomzellen (vier Mutationen auf 29 untersuchte Einzelzellen) umso auffälliger. Die Disseminierung muß also bereits vor dem Auftreten der *KRAS*-Mutation stattgefunden haben. Da bereits bei der Krebsvorstufe der Pankreatischen Intraepithelialen Neoplasie (PanIN) *KRAS*-Mutationsraten von 60-80% beschrieben sind (Yonezawa *et al.*, 2008), bedeutet dies, daß eine Streuung der disseminierten Pankreaskarzinomzellen möglicherweise noch vor der PanIN stattgefunden hat. Tortola *et al.* hatten bereits 2001 ein Auftreten unterschiedlicher *KRAS*-Mutationen im Knochenmark und Primärtumoren von kolorektalen Tumoren beobachtet. So waren Primärtumore meist im Codon 12 mutiert, in den disseminierten Zellen des Knochenmarks zeigte sich dagegen häufiger eine Codon-13-Mutation. Auch dies gibt einen Hinweis auf eine möglicherweise frühzeitige Disseminierung und hinterfragt eine streng lineare Tumorprogression.

Lediglich zwei Pankreaskarzinom-Einzellzell-Primärtumorpaare weisen eine gemeinsame *KRAS*-Mutation auf (Panc-1: Codon 12 GGT -> GRT; Panc-6: Codon 12 GGT -> GKT). In letzterem war zudem eine gemeinsame *TP53*- und *KRAS*-Mutation gefunden worden, was zu

dem im nächsten Abschnitt näher erläuterten Modell einer linearen Tumorprogression passen könnte. Dies stellt unter den oben beschriebenen Daten aber eher eine Ausnahme dar.

Generell ist festzuhalten, daß deutlich mehr Mutationen in Primärtumoren als in disseminierten Einzelzellen aufgefunden werden konnten, obgleich hier mit einer höheren Rate an falsch-negativen Ergebnissen gerechnet werden musste. Es scheint daher zwingend zu folgern, daß disseminierte Tumorzellen häufig die primäre Läsion verlassen, bevor diese Mutationen im Genom fixiert werden.

#### **4.4 Bedeutung für das Verständnis der Metastasierung und für systemische Therapien**

Beim Colonkarzinom besteht die Vorstellung, daß die Tumorentstehung einen klar definierten Prozeß darstellt, in dem sich durch die Ansammlung von spezifischen Mutationen eine stufenweise Entwicklung von einem normalen Epithel über verschiedene Krebsvorstufen bis hin zum Karzinom vollzieht. So ist als früheste Veränderung die Mutation des *APC*-Gens bereits in hyperproliferativem Colonepithel angegeben. Nach einer Hypomethylierung des Genoms im Stadium des frühen Adenoms erfolgt auf dem Weg zum intermediären Adenom die *ras*-Aktivierung. Der Schritt vom intermediären Adenom zum späten Adenom ist durch einen Verlust der Heterozygotie (LOH) des *DCC*-Gens gekennzeichnet. Erst für die Entwicklung des späten Adenoms zum Karzinom ist der Verlust der *p53*-Funktion und die *PIK3CA*-Mutation postuliert (Fearon und Vogelstein, 1990; Boughdady *et al.*, 1992; Aaltonen *et al.*, 1993; Kinzler und Vogelstein, 1996; Jones *et al.*, 2008).

Für das Pankreaskarzinom ist eine ähnliche Abfolge von Mutationen beschrieben: Eine aktivierende *KRAS*-Mutation wird bereits bei geringgradigen Krebsvorstufen (PanIN-1 = Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie Grad 1) gefunden. In intermediären Krebsvorstufen (PanIN-2) kommt es zu inaktivierenden Mutationen des *p16/CDKN2A*-Gens, während inaktivierende Mutationen von *SMAD*, *TP53* sowie *BRCA2* in PanIN-3 vorhanden sind. Die Mutationen im *KRAS*-Gen kommen in 90-95% der Pankreaskarzinome vor, wobei bereits im Stadium der PanIN-1 eine Mutationsrate von 36-44%, bei der PanIN-2/3 von 87% angegeben wird. Eine *TP53*-Inaktivierung findet sich in 50-75% der Pankreaskarzinome, meistens vom bekannten Verlust des zweiten Allels begleitet.

Demzufolge sollte es im Fall des Pankreaskarzinoms nahezu keine Tumorzelle ohne *KRAS*-Mutation geben, was angesichts der äußerst geringen Zahl von *KRAS*-Mutationen in den disseminierten Tumorzellen den Schluß nahelegt, daß diese bereits vor dem Erwerb einer *KRAS*-Mutation im Zustand der geringgradigen intraepithelialen Neoplasie disseminiert sein müssen. Möglicherweise ist die noch geringere Zahl der *TP53*-Mutationen hierfür ein unterstützendes Element, da diese Alteration als ein Charakteristikum der späten intraepithelialen Neoplasie gilt. Weitere Unterstützung erhält diese Interpretation von

Beobachtungen bei einem transgenen Mammakarzinom-Mausmodell, in dem die Streuung von Tumorzellen bereits im Stadium der atypischen Hyperplasie beginnt (Hüseemann et al., 2008).

Zusammenfassend lassen sich für alle untersuchten Tumorentitäten zwei Punkte festhalten: Die dissemierten Zellen tragen in einer deutlich geringeren Frequenz die von der Primärtumoranalyse her zu erwartenden Punktmutationen. Darüber hinaus besteht ein hohes Maß an Heterogenität zwischen Primärtumor und Einzelzellen. Beide Punkte widersprechen dem Konzept einer streng klonalen, linearen Weitergabe von Mutationen durch den prädominanten Klon eines Primärtumors. Vielmehr scheinen die dissemierten Zellen den Primärtumor bereits verlassen zu haben, bevor der maligne Phänotyp, hier angenommen als definiert durch den Erwerb der untersuchten Mutationen, vollständig ausgebildet war. Das hierdurch unterstützte Modell einer parallelen Tumorpregression (Klein, 2009; Stoecklein und Klein, 2010) beschreibt die Möglichkeit einer Selektion der dissemierten Zellen außerhalb des Primärtumors, angepaßt an das jeweilige Mikromillieu. Die fehlende Klonalität der dissemierten Zellen ist dabei Ausdruck einer noch nicht stattgefunden Selektion des für eine Metastasengründung am besten geeigneten Klons.

Das Fehlen einer genetischen Gemeinsamkeit dieser Zellen macht sie für eine systemische Therapie schwer greifbar: Die aktuell noch vorherrschenden, auf Zytotoxizität beruhenden Systemtherapien laufen Gefahr, aufgrund der Heterogenität der disseminierten Zellen resistente Klone übrig zu lassen. Außerdem wirkt eine zytotoxische Therapie größtenteils auf sich teilende Zellen, womit Tumorzellen im Stadium der *tumor dormancy* einen weiteren Überlebensvorteil hätten. Letzter könnte durch eine analog der zytotoxischen Therapie als Cocktail unterschiedlicher monoklonaler Antikörper und niedermolekularer Verbindungen („small molecules“) konzipierte Therapie, die sich gegen Oberflächeneigenschaften der Tumorzellen richtet oder den Tumorzellen eigene Stoffwechselwege angreift, überwunden werden. Es bleibt aber das Problem der Heterogenität, so daß die Suche nach einer möglichst von allem Tumorzellen geteilten, frühen Mutation und damit tumorspezifischen therapeutischen Zielstruktur weiter ein vordringliches Ziel bleibt.

## 5. Zusammenfassung

Der Nachweis cytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark und Lymphknotenpräparaten ohne klinisch manifesten Lymphknotenbefall von Krebspatienten zum Zeitpunkt der Operation ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben. Aufgrund der Heterogenität der (nach vollständiger chirurgischer Entfernung des Primärtumors) noch im Körper befindlichen disseminierten Tumorzellen erscheint eine adjuvante systemische Therapie als nicht sicher erfolgversprechend, weswegen in der vorliegenden Arbeit nach möglichst frühzeitigen und weitverbreiteten Veränderungen gesucht wurde.

Hierfür wurden das Tumorsuppressorgen *TP53*, das in der Hälfte aller menschlichen Tumoren mutiert ist, *PIK3CA* mit Mutationsraten für das Colonkarzinom um die 30% sowie das *KRAS*-Gens, das im Falle des Pankreaskarzinoms mit einer Mutationsrate von über 80% bereits in der Mehrzahl der Krebsvorstufen sowie bei nahezu sämtlichen Karzinomen mutiert ist, ausgewählt.

Zunächst mußte aber im Vorfeld die Sensitivität und Spezifität der Punktmutationsanalyse bei einzelnen Tumorzellen bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, daß in 10% der Nicht-Tumorzellen sowie in 10-25% der disseminierten Tumorzellen ein Signalverlust stattfindet. Eine DNA-Analyse aus formalinfixiertem und paraffineingebetteten Gewebe wies mit steigender Mse-I-Fragmentgröße Verlustraten von weit über 50% auf und konnte daher kaum verwertbare Informationen, insbesondere zum Vergleich mit den betreffenden disseminierten Tumorzellen liefern.

Die Rate an *TP53*-, insbesondere aber *KRAS*-Mutationen in disseminierten Tumorzellen lag deutlich unter den Erwartungen des betreffenden Tumortyps. Zusätzlich zeigte sich ein hohes Maß an Heterogenität zwischen disseminierten Tumorzellen und dem jeweiligen Primärtumor, so daß eine lineare Tumorentwicklung als unwahrscheinlich erachtet wird und das Konzept einer parallelen Progression der disseminierten Zellen neben dem Primärtumor mit zunächst starker Heterogenität und darauf folgender Selektion in der Peripherie favorisiert wird. Darüber hinaus ergeben sich aus der äußerst geringen Rate von *KRAS*-Mutationen in disseminierten Tumorzellen von Pankreaskarzinompatienten Hinweise, daß Tumoren bereits in prämaligen Stadien zur Disseminierung fähig sein könnten.



## 6. Literaturverzeichnis

- Aaltonen L. A., Peltomäki P., Leach F. S., Sistonen P., Pylkkänen L., Mecklin J.-P., Järvinen H., Powell S. M., Jen J., Hamilton S. R., Peterson G. M., Kinzler K. W., Vogelstein B. and de la Chapelle A. (1993). Clues to the Pathogenesis of Familial Colorectal Cancer, *Science* **260**: 812-16.
- Almoguera C., Shibata D., Forrester K., Martin J., Arnheim N., Perucho M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**: 549-54.
- Andreyev H. J. N., Norman A. R., Cunningham D., Oates J., Dix B. R., Iacopetta B. J., Young J., Walsh T., Ward R., Hawkins N., Beranek M., Jandik P., Benamouzig R., Jullian E., Laurent-Puig P., Olschwang S., Muller O., Hoffmann I., Rabes H. M., Zietz C., Troungos C., Valavanis C., Yuen S. T., Ho J. W. C., Croke C. T., O'Donoghue D. P., Giaretti W., Rapallo A., Russo A., Bazan V., Tanaka M., Omura K., Azuma T., Ohkusa T., Fujimori T., Ono Y., Pauly M., Faber C., Glaesener R., de Goeij A. F. P. M., Arends J. W., Andersen S. N., Lövig T., Breivik J., Gaudernack G., Clausen O. P. F., De Angelis P., Meling G. T., Rognum T. O., Smith R., Goh H.-S., Font A., Rosell R., Sun X. F., Zhang H., Benhattar J., Losi L., Lee J. Q., Wang S. T., Clarke P. A., Bell S., Quirke P., Bubb V. J., Piris J., Cruickshank N. R., Morton D., Fox J. C., Al-Mulla F., Lees N., Hall C. N., Snary D., Wilkinson K., Dillon D., Costa J., Pricolo V. E., Finkelstein S. D., Thebo J. S., Senagore A. J., Halter S. A., Wadler S., Malik S., Krtolica K., and Urosevic N. (2001). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: The 'RASCAL II' study. *British Journal of Cancer* **85**: 692-96.
- Abedi-Ardekani B., Kamangar F., Sotoudeh M., Villar S., Islami F., Aghcheli K., Nasrollahzadeh D., Taghavi N., Dawsey S., Abnet C., Hewitt S., Fahimi S., Saidi F., Brennan P., Boffetta P., Malekzadeh R., Hainaut P. (2011). Extremely high TP53 mutation load in esophageal squamous cell carcinoma in Golestan Province, Iran. *PLoS One* doi: 10.1371/journal.pone.0029488.
- Ashcroft M., Kubbutat M., Vousden K. (1999). Regulation of p53 Function and Stability by Phosphorylation. *Mol Cell Biol* **19**: 1751-8.
- Bellini M., Cadamuro A., Succi M., Proença M., Silva A. (2012). Alterations of the TP53 Gene in Gastric and Esophageal Carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* doi: 10.1155/2012/891961.
- Beltran H., Yelensky R., Frampton G., Park K., Downing S., Macdonald T., Jarosz M., Lipson D., Tagawa S., Nanus D., Stephens P., Mosquera J., Cronin M., Rubin M. (2012). Targeted Next-generation Sequencing of Advanced Prostate Cancer Identifies Potential Therapeutic Targets and Disease Heterogeneity. *Eur Urol.* 2012 Sep 5. doi:pui: S0302-2838(12)01006-8.

- Bianco F., Wood D., Gomes de Oliveira J., Nemeth J., Beaman A., Cher M. (2001). Proliferation of prostate cancer cells in the bone marrow predicts recurrence in patients with localized prostate cancer. *Prostate* **49**: 235-42.
- Bieging K., Attardi L. (2012). Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends Cell Biol* **22**: 97-106
- Borresen-Dale A.-L. (2003). TP53 and Breast Cancer. *Human Mutation* **21**: 292-300.
- Bos J.L. (1989). Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review, *Cancer Research* **49**: 4682-9.
- Boughdady I. S., Kinsella A. R., Haboubi N. Y. and Schofield P. F. (1992). K-ras gene mutations in adenomas and carcinomas of the colon. *Surgical Oncology* **1**: 275-82.
- Braun S., Pantel K., Muller P., Janni W., Hepp F., Kentenich C. R., Gastroph S., Wischnik A., Dimpfl T., Kindermann G., Riethmuller G., and Schlimok G. (2000). Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* **342**: 525-33.
- Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**: 61-70.
- Cantley L. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**: 1655-7.
- Cariello N., Swenberg J., De Bellis A., Skopek T. (1991). Analysis of mutations using PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Environ Mol Mutagen* **18**: 249-54.
- Caspari T. (2000). How to activate p53. *Curr Biol* **10**: R315-7.
- Chan W., Siu W., Lau A., Poon R. (2004). How Many Mutant p53 Molecules Are Needed To Inactivate a Tetramer? *Mol Cell Biol* **24**: 3536-51.
- Chang Y., Wu C., Shih J., Lee Y. (2011). Comparison of p53 and epidermal growth factor receptor gene status between primary tumors and lymph node metastases in non-small cell lung cancers. *Ann Surg Oncol* **18**: 543-50.
- Cline J., Braman J., Hogrefe H. (1996). PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **24**: 3546-51.
- Cully M., You H., Levine A. J. and Mak T. W. (2006). Beyond PTEN mutations: the P13K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* **6**: 184-92.
- Dearnaley D., Sloane J., Ormerod M., Steele K., Coombes R., Clink H., Powles T., Ford H., Gazet J., Neville A. (1981). Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* **44**: 85-90.
- Dearth L., Qian H., Wang T., Baroni T., Zeng J., Chen S., Yi S., Brachmann R. (2007). Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis* **28**: 289-98.
- Dittmer D., Pati S., Zambetti G., Chu S., Teresky A. K., Moore M., Finlay C. and Levine A. J. (1993). Gain of function mutation in p53. *Nature Genetics* **4**: 42-6.
- Dong J. (2006). Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem* **15**: 433-47.

- Done S., Eskandarian S., Bull S., Redston M., Andrulis I. (2001). p53 missense mutations in microdissected high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* **93**:700-4.
- Eckert K., Kunkel T. (1990). High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **18**: 3739-44.
- Fearon E., and Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-67.
- Frey B. and Suppmann B. (1995). Demonstration of the Expand™ PCR System's Greater Fidelity and Higher Yields with a lacl-based PCR Fidelity Assay. *Biochemica* **2**: 8-9.
- Gerber B., Krause A., Müller H., Richter D., Reimer T., Makovitzky J., Herrnring C., Jeschke U., Kundt G., and Friese K. (2001). Simultaneous Immunohistochemical Detection of Tumor Cells in Lymph Nodes and Bone Marrow Aspirates in Breast Cancer and Its Correlation With Other Prognostic Factors. *J Clin Oncol* **19**: 960-71.
- González-Aguilera J., Herrero M., Maillo C., Moreno-Azcoita M., Fernández-Peralta A. (1999). Loss of heterozygosity of TP53 is not correlated with clinicopathological variables in sporadic colorectal carcinomas. *Anticancer Res* **19**: 1325-9.
- Greenblatt M., Bennett W., Hollstein M., Harris C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* **54**: 4855-78.
- Glavac D. and Dean M. (1993). Optimization of single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human Mutat* **2**: 404-141
- Gumerlock P., Chi S., Shi X., Voeller H., Jacobson J., Gelmann E., deVere White R. (1997). p53 abnormalities in primary prostate cancer: Single strand conformation polymorphism analysis of complementary DNA in comparison with genomic DNA. *J Natl Cancer Inst* **89**: 66-71.
- Harris C., Hollstein M. (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* **329**: 1318-27.
- Hayashi K. and Yandell D. W. (1993). How Sensitive Is PCR-SSCP? *Human Mutation* **2**: 338-46.
- Ho G., Calvano J., Bisogna M., Borgen P., Rosen P., Tan L., Van Zee K. (2000) In microdissected ductal carcinoma in situ, HER-2/neu amplification, but not p53 mutation, is associated with high nuclear grade and comedo histology. *Cancer* **89**: 2153-60.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C. (1991). p53 mutation in human cancers. *Science* **253**: 49-53.
- Hollstein M., Rice K., Greenblatt M., Soussi T., Fuchs R., Smith-Sørensen B., Montesano R., and Harris C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines *Nucleic Acids Research* **22(17)**: 3551-5.

- Hosch S., Knoefel W., Metz S., Stoecklein N., Niendorf A., Broelsch C., Izbicki J. (1997). Early lymphatic tumor cell dissemination in pancreatic cancer: frequency and prognostic significance. *Pancreas* **15**: 154-9.
- Hosch S., Kraus J., Scheunemann P., Izbicki J., Schneider C., Schumacher U., Witter K., Speicher M., Pantel K. (2000). Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. *Cancer Res* **60**: 6836-40.
- Hruban R. H., van Mansfeld A. D. M., Offerhaus G. J. A., van Weering D. H. J., Allison D. C., Goodman S. N., Kensler T. W., Bose K. K., Cameron J. L. Bos J. L. (1993). K-ras Oncogene Activation in Adenocarcinoma of the Human Pancreas. A Study of 82 Carcinomas Using a Combination of Mutant-Enriched Polymerase Chain Reaction Analysis and Allele-Specific Oligonucleotide Hybridization. *AJP* **143/2**: 545-54
- Hu W. (2009). The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10.1101/cshperspect.a001073.
- Hüsemann Y., Geigl J. B., Schubert F., Musiani P., Meyer M., Burghart E., Forni G., Eils R., Fehm T., Riethmüller G. and Klein C. A. (2008). Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer. *Cancer Cell* **13**: 58-68
- Ito S., Ohga T., Saeki H., Nakamura T., Watanabe M., Tanaka S., Kakeji Y., Maehara Y. (2005). p53 mutation profiling of multiple esophageal carcinoma using laser capture microdissection to demonstrate field carcinogenesis. *Int J Cancer* **113**: 22-8.
- Izbicki J. R., Hosch S. B., Pichlmeier U., Rehders A., Busch C., Niendorf A., Passlick B., Broelsch C. E., and Pantel K. (1997). Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N Engl J Med* **337**: 1188-94.
- Jones S., Chen W., Parmigiani G., Diehl F., Beerenwinkel N., Antal T., Traulsen A., Nowak M., Siegel C., Velculescu V., Kinzler K., Vogelstein B., Willis J. and Markowitz S. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *PNAS* **105**: 4283-8
- Kieser A., Weich H., Brandner G., Marmé D., Kolch W. (1994). Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* **9**: 963-9.
- Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-70.
- Keohavong P., Thilly W. (1989). Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9253-7.
- Klein C. A., Schmidt-Kittler O., Schardt J. A., Pantel K., Speicher M. R., and Riethmüller G. (1999). Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4494-9.
- Klein C. A., Seidl S., Petat-Dutter K., Offner S., Geigl J. B., Schmidt-Kittler O., Wendler N., Passlick B., Huber R. M., Schlimok G., Baeuerle P. A., and Riethmüller G. (2002).

- Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* **20**: 387-9.
- Klein C. A., Blankenstein T. J. F., Schmidt-Kittler O., Petronio M., Polzer B., Stoecklein N. H., Riethmüller G. (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* **360**: 683-92.
- Klein C. A. (2003). The systemic progression of human cancer: A focus on the individual disseminated cancer cell - the unit of selection. *Adv Cancer Res* **89**: 35-67.
- Klein C. A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* **9**: 302-12.
- Knudson A. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 820-3.
- Ko L. J. and Prives C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes and Development* **10**: 1054-72.
- Koushik A., Platt R., Franco E. (2004). p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**: 11-22.
- Kranenburg O. (2005). The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta* **1756**: 81-2.
- Lakin N., and Jackson S. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* **18**: 7644-55.
- Leinung S., Würfl P., Weiss C., Röder I., Schönfelder M. (2000). Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* **385**: 337-43.
- Li D. and Jiao L. (2003). Molecular Epidemiology of Pancreatic Cancer. *International Journal of Gastrointestinal Cancer* **33(1)**: 3-13.
- Liao X., Morikawa T., Lochhead P., Imamura Y., Kuchiba A., Yamauchi M., Nosho K., Qian Z., Nishihara R., Meyerhardt J., Fuchs C., Ogino S. (2012). Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Clin Cancer Res* **18**: 2257-68.
- Lindemann F., Schlimok G., Dirschedl P., Witte J., and Riethmüller G. (1992). Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* **340**: 685-9.
- Ling L., Keohavong P., Dias C., Thilly W. (1991). Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and vent DNA polymerases. *PCR Methods Appl* **1**: 63-9.
- Liu Y., and Bodmer W. (2006). Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 976-981.
- Loeb K. R. and Loeb L. A. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* **21**: 379-85.

- Madani K., Zhao R., Lim H., Casson A. (2010). Prognostic value of p53 mutations in oesophageal adenocarcinoma: final results of a 15-year prospective study. *Eur J Cardiothorac Surg* **37**: 1427-32.
- McLure, K. and Lee, P. (1998). How p53 binds DNA as a tetramer. *The EMBO Journal* **17**: 3342-50.
- Maitra A., Hruban R. (2008). Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* **3**: 157-88.
- Mansi J., Berger U., Easton D., McDonnell T., Redding W., Gazet J., McKinna A., Powles T., and Coombes R. (1987). Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases. *Br Med J* **295**:1093-6.
- Milner J., Medcalf E., Cook A. (1991). Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol* **11**: 12-9.
- Morelli M., Kopetz S. (2012). Hurdles and complexities of codon 13 KRAS mutations. *J Clin Oncol* **30**: 3565-7.
- Morton, N. (1991). Parameters of the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7474-6.
- Müller P., Weckermann D., Riethmüller G., Schlimok G. (1996). Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **88**: 8-16.
- Olschwang S., Hamelin R., Laurent-Puig P., Thuille B., De Rycke Y., Li Y., Muzeau F., Girodet J., Salmon R., Thomas G. (1997). Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12122-7.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. and Sekiya T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2766-70.
- O'Toole C., Price Z., Ohnuki Y., Unsgaard B. (1978). Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. *Br J Cancer* **38**: 64-76.
- Passlick B., Izbicki J. R., Kubuschok B., Nathrath W., Thetter O., Pichlmeier U., Schweiberer L., Riethmüller G., and Pantel K. (1994). Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **12**: 1827-32.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* **28**: 622-29.
- Rivlin N., Brosh R., Oren M., Rotter V. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer* **2**: 466-74.
- Rohini K., Mathivanan J., Prabhu P., Subbakrishna D., Gope M., Chandramouli B., Sampath S., Anandh B., Gope R. (2007). Loss of heterozygosity of the p53 gene and

- deregulated expression of its mRNA and protein in human brain tumors. *Mol Cell Biochem* **300**: 101-11.
- Samuels Y., Velculescu V. (2004). Oncogenic mutation of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle*. **3**: 1221-4.
- Samuels Y., Diaz L., Schmidt-Kittler O., Cummins J., DeLong L., Cheong I., Rago C., Huso D., Lengauer C., Kinzler K., Vogelstein B., Velculescu V. (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* **7**: 561-73.
- Scarpa A., Capelli P., Mukai K., Zamboni G., Oda T., Iacono C., Hirohashi S. (1993). Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am J Pathol* **142**: 1534-43.
- Schlimok G., Funke I., Holzmann B., Gottlinger G., Schmidt G., Hauser H., Swierkot S., Warnecke H. H., Schneider B., Koprowski H., and et al. (1987). Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8672-6.
- Schardt J., Meyer M., Hartmann C., Schubert F., Schmidt-Kittler O., Fuhrmann C., Polzer B., Petronio M., Eils R., Klein C. (2005). Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* **8**: 227-39.
- Schlechte H., Lenk S., Löning T., Schnorr D., Rudolph B., Ditscherlein G., Loening S. (1998). p53 tumor suppressor gene mutation in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Eur Urol* **34**: 433-40.
- Schmidt-Kittler O., Ragg T., Daskalakis A., Granzow M., Ahr A., Blankenstein T. J. F., Kaufmann M., Diebold J., Arnholdt H., Müller P., Bischoff J., Harich D., Schlimok G., Riethmüller G., Eils R., and Klein C. A. (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7737-42.
- Schneider P., Casson A., Levin B., Garewal H., Hoelscher A., Becker K., Dittler H., Cleary K., Troster M., Siewert J., Roth J. (1996). Mutations of p53 in Barrett's esophagus and Barrett's cancer: a prospective study of ninety-eight cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* **111**: 323-31.
- Sherr C. J. and Weber J. D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**: 94-9.
- Shieh S., Ikeda M., Taya Y., Prives C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**: 325-34.
- Shih C., Weinberg R. (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* **29**: 161-9.
- Shipman R., Schraml P., Colombi M., Raefle G., Dalquen P., Ludwig C. (1996). Frequent TP53 gene alterations (mutations, allelic loss, nuclear accumulation) in primary non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* **32A**: 335-41.

- Stegh A. (2012). Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - the promises, challenges and perils. *Expert Opin Ther Targets* **16**: 67-83.
- Stoecklein N. H., Erbersdobler A., Schmidt-Kittler O., Diebold J., Schardt J. A., Izbicki J. R., and Klein C. A. (2002). SCOMP Is Superior to Degenerated Oligonucleotide Primed-Polymerase Chain Reaction for Global Amplification of Minute Amounts of DNA from Microdissected Archival Tissue Samples. *Am J Pathol* **161**: 43-51.
- Stoecklein N. H., Klein C. A. (2010). Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int J Cancer* **126**: 589-98.
- Storey A., Thomas M., Kalita A., Harwood C., Gardiol D., Mantovani F., Breuer J., Leigh I., Matlashewski G., and Banks L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* **393**: 229-34.
- Takahashi T., Takahashi T., Suzuki H., Hida T., Sekido Y., Ariyoshi Y., Ueda R. (1991). The p53 gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with a distinct nucleotide substitution pattern. *Oncogene* **6**: 1775-8.
- Tamada H., Suzuki Y., Tamura G. (1994). Analysis of loss of heterozygosity (LOH) at the p53 and Rb suppressor genes in urinary bladder carcinoma. *Jpn J Urol* **85**: 722-30.
- Thorban S., Roder J., Nekarda H., Funk A., Siewert J., Pantel K. (1996). Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with esophageal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **88**: 1222-7.
- Tortola S., Steinert R., Hantschick M., Peinado M. A., Gasstinger I., Stosiek P., Lippert H., Schlegel W., and Reymond M. A. (2001). Discordance Between K-ras Mutations in Bone Marrow Micrometastases and the Primary Tumor in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* **19**: 2837-43.
- TP53-Datenbank der IARC (International Agency for Research on Cancer): <http://www-p53.iarc.fr/index.html>
- Velho S., Oliveira C., Ferreira A., Ferreira A., Suriano G., Schwartz S., Duval A., Carneiro F., Machado J., Hamelin R., Seruca R. (2005). The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer* **41**: 1649-54.
- van Boxtel R., Kuiper R., Toonen P., van Heesch S., Hermsen R., de Bruin A., Cuppen E. (2011). Homozygous and heterozygous p53 knockout rats develop metastasizing sarcomas with high frequency. *Am J Pathol* **179**: 1616-22.
- Vogelstein B., Fearon E. R., Hamilton S. R., Kern S. E., Preisinger A. C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. M., and Bos J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**: 525-32.
- Walker D., Bond J., Tarone R., Harris C., Makalowski W., Boguski M., Greenblatt M. (1999). Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene* **18**: 211-8.
- Weckermann D., Müller P., Wawroschek F., Harzmann R., Riethmüller G., and Schlimok G. (2001). Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value. *J Urol* **166**: 699-703.



- Wistuba I., Gazdar A., Minna J. (2001) Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol* **28**: 3-13.
- Whibley C., Pharoah P. D. P. and Hollstein M. (2009). P53 polymorphisms: cancer implications. *Nature Reviews Cancer* **9**: 95-107.
- Yonezawa S., Higashi M., Yamada N., Goto M. (2008). Precursor lesions of pancreatic cancer. *Gut Liver* **2**: 137-54.

## 7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Christoph Klein danke ich für die Betreuung dieser Promotion sowie das fortwährende große persönliche Interesse am Fortschritt der Arbeit über all' die vielen Jahre hinweg. Sein unerreichbares Vorbild und seine unvergleichliche Frustrationstoleranz haben mir in schwierigen Phasen immer wieder zu neuem Schwung verholfen.

Gleiches gilt für Herrn Prof. Dr. Gert Riethmüller, der mir vor vielen Jahren Einlaß in das Institut für Immunologie gewährt und mich seither stets wohlwollend begleitet hat.

Zu großem Dank bin ich weiterhin unseren klinischen Partnern für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial und Patientendaten verpflichtet sowie zahlreichen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die Überlassung von Aliquots ihrer primären PCR-Produkte für meine Experimente - namentlich sind hier Oleg Schmidt-Kittler, Nikolas Stoecklein, Nicole Wendler, Sabine Schilling, Bernhard Polzer, Marco Petronio sowie Andreas Lübke zu erwähnen. Von Sandra Grunewald durfte ich die *PIK3CA*-Daten übernehmen.

Herzlichen Dank für die organisatorische und exzellente technische Hilfe von Tanja Siart und Elke Burghart bei der SSCP.

Ganz besonders herzlichen Dank an Oleg Schmidt-Kittler, Nikolas Stoecklein, Nicole Wendler und Manfred Meyer für den starken Rückhalt und zahllose größere und kleinere tägliche Hilfen.

Das freundschaftliche Miteinander und die Hilfsbereitschaft im Institut für Immunologie und der gute Kontakt auch zu Mitgliedern anderer Arbeitsgruppen, namentlich der AG Kufer, Pape und Wank, hat vieles vermeintlich Schwierige leichter gemacht.

Ein großer Dank zum Schluß gebührt erneut Bernhard Polzer, diesmal für die kritische Durchsicht und Korrektur des Manuskripts.

## 8. Anhang

**Tab. 14: in d. SSCP detektierte *KRAS*-Mutationen incl. Basen- & Aminosäureaustausch**

### ***KRAS* Codon 12:**

<u>GGT</u> -> GGN	Gly		
<u>GGT</u> -> GTT	Val	Sw480 (het.), PancTu 2584 PT 2636 PT 1 3295 PTn & Lk T4, 5, 8 11569 PT 20572 PT	Colon-, Pankreas-Ca-Zelllinie Pankreas-Ca-Patient Colon-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient
<u>GGT</u> -> GCT	Ala	MDA Panc3 (N. Lemoine)	Pankreas-Ca-Zelllinie
<u>GGT</u> -> GAT	Asp	2305 Lk T2 - 7 2337 PT & Lk T3 2349 KM T1, 2 (hom.) 2436 Lk T1 3300 PT 3445 PT 3978 PT 3 4429 PT 17 14128 PT 14751 PT 41 15834 PT 16433 PT 17733 PT 18132 PT 19519 PT	Colon-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient
<u>GGT</u> -> TGT	Cys	MiaPaCa2 (ATTC)	Pankreas-Ca-Zelllinie
<u>GGT</u> -> CGT	Arg	2432 PT 2501 PT 5678 PT	Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient Pankreas-Ca-Patient
<u>GGT</u> -> AGT	Ser	2336 Lk T2 (hom.)	Colon-Ca-Patient

### ***KRAS* Codon 13:**

<u>GGC</u> -> GAC	Asp	5905 PT	Pankreas-Ca-Patient
-------------------	-----	---------	---------------------

Tab. 15: Homo-/Heterozygotie einer *TP53*-Mutation und *Mse*-I-Fragmentverlust

	exon 4 I	exon 4 II	exon 4 III	exon 5	exon 6	exon 7	exon 8	exon 9	TP53-Sequenz	homo./het.	Ausfälle (n)
BC-1 TZ1	CCC	0*	1	mut	1	1	1	1	179: CAT → TAT (His → Tyr)	homozygot	
BC-2 TZ1	0	0	0	0	0	0	mut	1	298: CAG → TAG (Glu → Stop)	homozygot	3
BC-3 TZ1	CgC	1	1	1	1	1	mut	1	298: GAG → TAG (Glu → Stop)	homozygot	
BC-3 TZ2	0	0	0	1	1	1	mut	1	298: GAG → TAG (Glu → Stop)	homozygot	1
BC-4 TZ2	0*	1	1	1	mut	1	1	1	215: AGT → GGT (Ser → Gly)	homozygot	
BC-4 TZ3	CgC	0*	1	1	mut	1	1	1	215: AGT → GGT (Ser → Gly)	homozygot	
BC-4 TZ4	CgC	1	1	1	mut	1	1	1	215: AGT → GGT (Ser → Gly)	homozygot	
BC-5 TZ2	CCC/CgC	0*	1	1	mut	1	1	1	213: CGA → CGR (Arg → Arg)	heterozygot	
BC-7 TZ1	CgC	1	1	1	1	mut	1	1	70: GCT → GTT (Ala → Val) 71: del -1 257: CTG → CYG (Leu → Pro)		
PC-2 TZ2	CgC	1	1	mut	1	1	1	1	136: CAA → TAA (Glu → Stop)	homozygot	
PC-2 TZ3	CgC	1	1	mut	1	1	1	1	136: CAA → TAA (Glu → Stop)	homozygot	
OeCu-1 TZ1	CgC	1	0*	mut	1	1	1	1	175: CGC → CRC (Arg → His)	heterozygot	
OeCu-2 TZ2	CgC	1	1	mut	1	1	mut	1	175: CGC → CAC (Arg → His) 292: del -1 het		
OeCu-2 TZ3	CgC	1	1	mut	1	1	1	1	175: CGC → CAC (Arg → His)	homozygot	
OeCu-2 TZ4	CgC	1	1	mut	1	1	1	1	175: CGC → CRC (Arg → His)	heterozygot	
Panc-6 KL-TZ1	CgC	1	1	1	1	1	mut	1	274: del -1 hom	homozygot	
Panc-6 LK-TZ2	CgC	1	1	1	1	1	mut	1	274: del -1 hom	homozygot	
Panc-6 LK-TZ3	CgC	1	1	1	1	1	mut	1	274: del -1 het	heterozygot	
Colon-1 LK-TZ2	CgC, mut	1	1	1	1	1	1	1	67: CCA → YCA (Pro → Ser)	heterozygot	
Colon-2 TZ2	0	0	0	0	0	0	n. seq.-bar	mut	Chromosom 12p-Sequenz 309: CCT → TCC (Pro → Ser)	homozygot	3
Colon-4 TZ1	0	0	0	0	0	0	n. seq.-bar	mut	Chromosom 12p-Sequenz 309: CCT → TCC (Pro → Ser)	homozygot	3
Colon-4 LK-TZ1	CgC	1	1	mut	1	1	1	1	153: CCC → CCY (Pro → Pro) 175: CGC → CGC (Arg → His)		
Colon-5 LK-TZ5	CgC	1	1	1	1	0	seq. wt	mut	309: CCC → TCC (Pro → Ser) 320: AAG → ARG (Lys → Arg)		1

1 = positives PCR-Signal. 0 = negatives PCR-Signal. Die Exons 4, 5&6, 7 sowie 8&9 liegen jeweils auf einem *Mse*-I-Fragment. Ein *Mse*-I-Fragmentverlust wurde bei Ausfall aller hieraufzu erwartenden PCR-Signale gewertet, der Ausfall nur eines PCR-Signals (0\*) stellt eher ein methodisches Problem dar und wurde nicht in die Bewertung mit einbezogen.

## 9. aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

### Publikationen:

Christoph A. Klein, **Thomas J.F. Blankenstein**, Oleg Schmidt-Kittler, Marco Petronio, Bernhard Polzer, Nikolas Stoecklein, Gert Riethmüller: Excessive genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002; 360: 683-9.

Oleg Schmidt-Kittler, Thomas Ragg, Angela Daskalakis, Martin Granzow, Andre Ahr, **Thomas J.F. Blankenstein**, Manfred Kaufmann, Joachim Diebold, Hans Arnholdt, Peter Müller, Joachim Bischoff, Detlev Harich, Günter Schlimok, Gert Riethmüller, Roland Eils and Christoph A. Klein: From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression. *PNAS* 2003; abc: xyz.

### Posterpräsentationen:

**Thomas J. F. Blankenstein**, Oleg Schmidt-Kittler, Nikolas H. Stoecklein, Bernhard Polzer, Marco Petronio, Gert Riethmüller, Christoph A. Klein: Extensive genomic diversity of single disseminated cancer cells is followed by genome stabilization during systemic cancer progression. AACR Special Conference in Cancer Research - Cancer and Chromosomal Organization / Epigenetics of Cancer 2001, Palm Desert

### Publizierte Abstracts:

**Blankenstein, TJF**; Schmidt-Kittler, O; Klein, CA: Mutationsanalyse des p53-Tumorsuppressorgens einzelner disseminierter Tumorzellen. *Research Festival 2000*, 220

**Blankenstein, TJF**; Schmidt-Kittler, O; Riethmüller, G and Klein, CA: Detection of p53 mutations in single disseminated tumor cells from bone marrow of carcinoma patients by direct DNA sequence analysis. *Cytotherapy* 2001, 3 (4): 321-354

Stoecklein NH, **Blankenstein TJF**, Petronio M, Hosch SB, Erbersdobler A, Izbicki JR, Riethmüller G, Klein CA: Genetic alterations of minimal residual tumor cells detected in patients with operable esophageal carcinoma. *Cytotherapy* 2001, 3 (4): 321-354

Stoecklein NH, Petronio M, **Blankenstein TJF**, Hosch SB, Erbersdobler A, Izbicki JR, Riethmüller G, Klein CA: Genetic alterations of micrometastatic tumor cells in patients with operable esophageal carcinoma. *Gastroenterology* 2001, 120 (5) Suppl 1: A344

Stoecklein NH, Petronio M, **Blankenstein TJF**, Hosch SB, Izbicki JR, and Klein CA: Genetic alterations of single micrometastatic tumor cells isolated from patients with operable esophageal cancer. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 2002, 43, #3630

**Vorträge:**

**Thomas J. F. Blankenstein:** Molecular genetic characterization of single disseminated cancer cells: From minimal residual disease to overt metastasis. Symposium "Detection of occult tumour cells" April 18<sup>th</sup>, 2002, Leiden

**Thomas J.F. Blankenstein, Oleg Schmidt-Kittler, Wolfgang Janni, Gert Riethmüller, Klaus Friese & Christoph A. Klein:** Molecular genetic analysis of single disseminated breast cancer cells. "1. AGO Symposium der wissenschaftlichen Arbeitsgruppen zur aktuellen Forschung beim Mammakarzinom" 6.-8.11.2003, Joachimsthal / Werbellinsee

## **Eidesstattliche Versicherung**

Blankenstein, Thomas

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Mutationsanalyse von TP53, KRAS und PIK3CA bei einzelnen disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark von Karzinompatienten*

selbständig verfaßt, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des weiteren, daß die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 11.02.2013

---