

Aus der Medizinischen Poliklinik  
Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

**Optimierung einer Methode zum Nachweis von p53 - Mutationen  
in der Kolonlavage bei kolorektalen Neoplasien**

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

Vorgelegt von  
Michael Braun  
aus München  
2005

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Hr. PD Dr. med. C. Folwaczny

Mitberichterstatter: PD Dr. med. P. Frauenberger  
PD Dr. med. F. T. Kolligs

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Fr. Dr. med. H. Török

Dekan: Hr. Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2005

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	5
1.1.	Epidemiologie.....	5
1.2.	Kolorektale Adenome.....	6
1.3.	Kolorektale Karzinome.....	6
1.4.	Adenom-Karzinom-Sequenz .....	8
1.5.	p53-Tumorsuppressorgen .....	11
1.6.	Screening-Methoden.....	14
1.6.1.	Fäkale okkulte Bluttestung (Haemoccult®-Test).....	14
1.6.2.	Koloskopie.....	15
2.	Zielsetzung .....	16
3.	Material und Methoden .....	17
3.1.	Patientenkollektiv .....	17
3.2.	DNA Extraktion aus Lavageproben .....	19
3.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	20
3.4.	Agarosegel-Elektrophorese .....	22
3.5.	Reinigung der PCR-Produkte .....	23
3.6.	SSCP-Elektrophorese .....	23
3.7.	Silberfärbung .....	25
3.8.	Sequenzierung .....	25
4.	Ergebnisse.....	28
4.1.	Sensitivität der Methode.....	28
4.2.	Ergebnisse der SSCP-Analyse.....	29
4.3.	Ergebnisse der Sequenzierung.....	32
4.4.	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	32
4.4.1.	Einfluss der Karzinomgröße auf das Ergebnis .....	33
4.4.2.	Einfluss von zusätzlich vorhandenen Adenomen auf das Ergebnis .....	35
4.4.3.	Einfluss der TNM-Klassifikation auf das Ergebnis.....	39
4.4.4.	Einfluss des Patientenalters auf das Ergebnis.....	46
4.4.5.	Einfluss der Tumorlokalisierung auf das Ergebnis.....	48
5.	Diskussion .....	50
5.1.	Stand der Forschung .....	50
5.2.	Methodik- und Ergebnisdiskussion .....	53
6.	Zusammenfassung .....	59

7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	60
8. Literaturverzeichnis .....	63
9. Danksagung .....	75
10. Lebenslauf .....	76

# 1. Einleitung

## 1.1. Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist in den Industrienationen die zweithäufigste Todesursache durch maligne Tumoren. Auf Platz eins steht bei Frauen der Brustkrebs, bei Männern das Bronchialkarzinom. Das kolorektale Karzinom ist verantwortlich für mehr als 10 % aller Krebstoten<sup>51</sup>. Pro Jahr sind 30 / 100.000 Einwohner betroffen, mit zunehmender Inzidenz. So hat sich beispielsweise bei steigender Lebenserwartung die Inzidenz kolorektaler Karzinome von 1960 bis 1980 verdoppelt<sup>89</sup>. 90 % der kolorektalen Karzinome treten nach dem 50. Lebensjahr auf. Die Inzidenz verdoppelt sich bei über 40 jährigen etwa alle zehn Jahre.

Risikofaktoren für die Erkrankung sind Ernährungsgewohnheiten, genetische Disposition und Präkanzerosen. Das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms korreliert mit der Zusammensetzung der Nahrung. Zahlreiche klinische und epidemiologische Studien haben gezeigt, dass fett- und fleischreiche Kost, sowie Übergewicht das Risiko für ein kolorektales Karzinom erhöhen. Faserreiche Kost und körperliche Aktivität hingegen haben eine protektive Wirkung<sup>34,83,102,103,106</sup>. Dieser Umstand weist darüber hinaus auf einen Zusammenhang zwischen westlichem Ernährungstyp und einer erhöhten Inzidenz kolorektaler Karzinome in Industrienationen hin.

Neben diesen äußeren Einflüssen kann auch eine genetische Disposition Ursache für die Erkrankung sein. Verwandte ersten Grades von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom haben ein nahezu doppelt erhöhtes Risiko, ebenfalls an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken<sup>33,37</sup>. Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP), einer autosomal-dominant vererbten Mutation des APC-Tumorsuppressorgens, erkranken nahezu ausnahmslos an einem kolorektalen Karzinom. Bei der FAP kommt es zum Auftreten multipler (>100) kolorektaler Adenome. Auch das hereditäre, nicht-polypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC), das ebenfalls autosomal-dominant vererbt wird, geht mit einem erhöhten Risiko einher. Ohne die heute üblichen Screeningmethoden würden 70-80 % der HNPCC Patienten an einem kolorektalen Karzinom erkranken<sup>80</sup>.

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa stellen eine Präkanzerose dar. Insbesondere bei langjähriger Colitis ulcerosa steigt das mittlere Risiko eines kolorektalen Karzinoms auf ca. 10 %<sup>28</sup>. Die bedeutendste Präkanzerose ist das Adenom des Kolons. Der Großteil aller kolorektalen Karzinome entwickelt sich auf der Basis eines solchen Adenoms.

## 1.2. Kolorektale Adenome

Ca. 10 % der Erwachsenen haben Polypen im Kolon, wobei die Inzidenz mit dem Alter zunimmt. Mehr als die Hälfte aller Polypen sitzen im Rektum. Es handelt sich dabei um hyperproliferative Schleimhautvorwölbungen in das Darmlumen, die ihren Ursprung im Epithel nehmen. Man unterscheidet adenomatöse, hamartomatöse, entzündliche und die am häufigsten auftretenden hyperplastischen Polypen (ca. 80 %).

Adenomatöse Polypen haben eine besondere Bedeutung bei der Entstehung des Kolonkarzinoms. Die Mehrzahl aller Kolonkarzinome entwickelt sich aus solchen Adenomen<sup>90</sup>. Die Entwicklung verläuft vom gesunden Gewebe über gering-, mittel- und hochgradige Epitheldysplasie. Dabei können die einzelnen Stadien dieser sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz genetischen Veränderungen zugeordnet werden (siehe 1.4.). Die Epitheldysplasie gilt dabei als Vorstufe des Karzinoms. Solange die Epitheldysplasie die Muscularis mucosae nicht infiltriert, erfolgt keine Metastasierung. Bei Überschreiten dieser Barriere liegt ein invasives Karzinom vor.

Nach der Wuchsform unterscheidet man gestielte und breitbasige Polypen, wobei letztere eine höhere Entartungstendenz aufweisen. Weiterhin unterscheidet man nach der Histologie drei verschiedene Adenomtypen: Das villöse Adenom (ca. 10 %), das tubulovillöse Adenom (ca. 15 %) und das am häufigsten vorkommende tubuläre Adenom (ca. 75 %). Das villöse Adenom weist mit bis zu 40 % das höchste Entartungsrisiko auf und wird deshalb auch als Präkanzerose bezeichnet<sup>108</sup>. Außerdem ist die Größe des Adenoms von Bedeutung. Adenome > 1 cm sind mit einem etwa vierfach erhöhten Karzinomrisiko assoziiert<sup>7,68,96</sup>. Auch das Auftreten multipler Adenome spielt eine Rolle. Bei mehr als drei kolorektalen Adenomen ist das Karzinomrisiko etwa sechsfach erhöht<sup>7,96</sup>.

Therapie der Wahl ist die koloskopische Abtragung des Polypen in toto mit der Basis. Die Histologie gibt Auskunft über die Entfernung im Gesunden, den Dysplasiegrad oder Malignitätsgrad. In Abhängigkeit vom histologischen Ergebnis kann dann die Indikation zur endoskopischen Nachkontrolle oder einem weiteren chirurgischem Vorgehen gestellt werden.

## 1.3. Kolorektale Karzinome

60 % der kolorektalen Karzinome sind im Rektum lokalisiert, 20 % im Colon sigmoideum, 10 % im Coecum bzw. Kolon ascendens und weitere 10 % lassen sich im übrigen Kolon finden. Die lymphogene Ausbreitung des Rektumkarzinoms findet über drei Metastasenstraßen in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation statt. Die Prognose ist um

so ungünstiger, je tiefer das Rektumkarzinom sitzt. Hochsitzende Rektumkarzinome (8-16 cm von der Anokutanlinie) breiten sich über eine Metastasenstraße in die paraaortalen Lymphknoten aus. Mittlere Rektumkarzinome (4-8 cm von der Anokutanlinie) breiten sich über zwei Metastasenstraßen zusätzlich in die Lymphknoten der Beckenwand aus. Tiefsitzende Rektumkarzinome (0-4 cm von der Anokutanlinie) breiten sich lymphogen über drei Metastasenstraßen zusätzlich zu den bereits genannten Wegen auch in inguinale Lymphknoten aus. Die hämatogene Metastasierung erfolgt zunächst über die Pfortader in die Leber, erst später auch in andere Organe. Eine Ausnahme bildet das tiefsitzende Rektumkarzinom, das über die Vena cava in die Lunge metastasiert.

Makroskopisch lassen sich polypöse, schüsselförmig ulzerierende, manschettenförmig stenosierende und diffus infiltrierende Tumoren unterscheiden. Histologisch handelt es sich fast immer um Adeno- und Gallertkarzinome, selten um Siegelringzell-, adenosquamöse und nichtklassifizierte Karzinome. Nach dem Differenzierungsgrad teilt man die Karzinome in gut, moderat, gering oder undifferenziert ein (G 1-4). Dieses Grading wird auch als Maß für die Malignität des Tumors verwendet.

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation, nach Dukes und Turnbull oder dem UICC-Stadium. Die Prognose ist abhängig vom Tumorstadium (Tabelle 1).

<b>TNM</b>	<b>Dukes / Turnbull</b>	<b>UICC</b>	<b>Definition</b>	<b>5-Jahre-Überlebensrate</b>
Tis, N0, M0		0	Carcinoma in situ	100 %
T 1-2, N0, M0	A	I	Tumor auf Mukosa und Submukosa / Muscularis propria beschränkt	75-80 %
T 3-4, N0, M0	B	II	Infiltration aller Wandschichten / Überschreitung der Darmwand	60-70 %
Tx, N 1-3, M0	C	III	Regionale Lymphknotenmetastasen	40-45 %
Tx, Nx, M 1	D	IV	Vorliegen von Fernmetastasen	5 %

**Tabelle 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms; T=Ausdehnung des Primärtumors, N=Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung, M=Fehlende oder vorhandene Fernmetastasen, X=jedes Stadium**

Therapie der Wahl bei kurativem Ansatz ist die radikale chirurgische Resektion des betroffenen Darmabschnitts. Kolorektale Karzinome wachsen weniger in die Länge als vielmehr in die Tiefe. Trotzdem ist ein ausreichender Resektionssicherheitsabstand einzuhalten. Wichtig ist die komplette Entfernung des regionalen Lymphabflussgebietes. Isolierte Leber- und Lungenmetastasen können mit kurativer Zielsetzung entfernt werden (Fünf-Jahre-Überlebensrate ca. 25 %). Bei sehr großen Rektumkarzinomen mit Infiltration in die umgebenden Organe wird eine präoperative Radio-/Chemotherapie (neoadjuvante Therapie) vorgeschaltet mit der Intention, den Tumor zu verkleinern und die Vitalität der

Tumorzellen bei der Operation zu reduzieren. Postoperative Radio-/Chemotherapie (adjuvante Therapie) führt in bestimmten Tumorstadien (Dukes B,C) zu einer Verbesserung der Fünf-Jahre-Überlebensraten. Eine lückenlose Nachsorge ist in allen Fällen indiziert um frühzeitig Rezidive und Metastasen zu erkennen.

#### **1.4. Adenom-Karzinom-Sequenz**

Die intensive Tumorforschung der jüngsten Zeit brachte die Erkenntnis, dass Krebs häufig eine genetische Erkrankung ist. Mehrere, aufeinander folgende Genmutationen führen im Verlauf von Jahren und Jahrzehnten zur Entstehung von Krebs. Unter der Annahme, dass es drei bis sieben solcher Genmutationen bedarf <sup>59</sup>, bis aus einer gesunden Zelle ein Malignom entsteht, ist das sogenannte „Multi-Hit-Konzept“ nach Vogelstein entstanden <sup>30</sup>. Am Beispiel einer normalen Zelle der Kolonschleimhaut lässt sich dieses Konzept verdeutlichen:

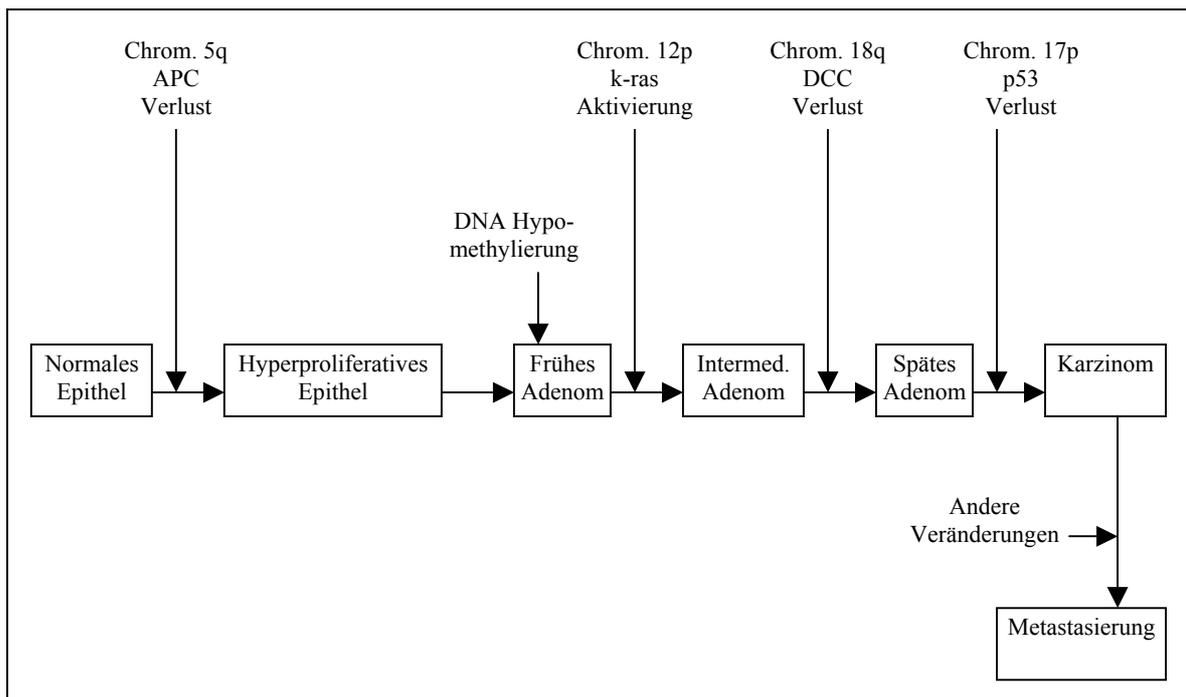
Eine erste, spontan auftretende Genmutation in solch einer Zelle würde zu einem gestörten Zellwachstum führen. Die klonale Zellteilung ist über Jahre beeinträchtigt. Ein Klon dieser Zellen unterliegt irgendwann einer zweiten Mutation, was zum Wachstum eines kleinen, gutartigen Adenoms führt. Dieses Adenom ist nur wenige Millimeter groß und die zelluläre Struktur beinahe normal. Im Laufe der Zeit wird das Wachstum des Adenoms unstrukturierter, die Größe nimmt zu. Eine dritte Genmutation in einer Zelle dieses Adenoms führt nun zu einer schnelleren Proliferation. Es kommt zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung dieses Zellklons. Dieser Prozess der Entartung einer gesunden Zelle zum bösartigen Tumor kann über Jahrzehnte andauern. Diese langsame Entwicklung erklärt auch die höheren Inzidenzen von Malignomen im Alter.

Das Konzept nach Vogelstein basiert auf der genetischen Untersuchung maligner Tumoren. Hier konnte nachgewiesen werden, dass in ein und demselben Tumor benigne Zellbereiche existieren, die genau die gleichen Mutationen besitzen, wie maligne, stark veränderte Zellbereiche. Mit dem Unterschied, dass bei den benignen Zellen entsprechend dem Multi-Hit-Konzept, wenigstens eine Genmutation weniger identifiziert wurde.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass bei der Entstehung von kolorektalen Tumoren immer nur ganz bestimmte Gene betroffen sind. Man unterscheidet eine Aktivierung von Onkogenen und eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Zu den Onkogenen zählt unter anderem das k-ras-Onkogen auf Chromosom 12p. Eine Aktivierung eines solchen Onkogens durch Mutation bringt der Zelle einen Wachstumsvorteil. Tumorsuppressorgene regulieren die Zellproliferation und hemmen abnormes Zellwachstum <sup>49</sup>. Eine

Inaktivierung eines solchen Gens durch eine Mutation ebnet den Weg für Tumorwachstum. Die bisher bekannten Tumorsuppressorgene sind das p53-Gen auf Chromosom 17p, das APC-Gen auf Chromosom 5q (familiäre adenomatöse Polyposis), das RB-Gen auf Chromosom 13q (Retinoblastom), das DCC-Gen auf Chromosom 18q (Deletion bei Kolonkarzinom), das WT1-Gen auf Chromosom 11p (Wilms Tumor) und das NF1-Gen auf Chromosom 17q (Neurofibromatose Typ 1).

Kolorektale Tumoren stellen ein ideales System zur Untersuchung der genetischen Veränderungen. Tumoren verschiedener Stadien, von kleinen Adenomen bis hin zu großen, metastasierenden Karzinomen stehen zur Verfügung, in denen, abhängig vom Tumorstadium, verschiedene somatische Genmutationen identifiziert werden können. Die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms ist daher genau beschrieben und es konnte eine Folge von Genmutationen festgelegt werden, die die Veränderung einer Epithelzelle zum Karzinom bedingen (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein<sup>30</sup>; Frühes Adenom  $\leq 1,0$  cm, Intermediäres Adenom  $> 1,0$  cm ohne Karzinomanteile, Spätes Adenom  $> 1,0$  cm mit Karzinomanteilen**

Am Anfang der kolorektalen Tumorgenese steht die Mutation des APC-Gens. Diese Mutation kann in heterozygoter Form in der Keimlinie vorhanden sein und prädisponiert zum Auftreten zahlreicher Adenome (FAP) im gesamten Kolon<sup>36,65</sup>. Sie kann aber auch spontan erfolgen und zum Wachstum eines einzelnen, sporadischen kolorektalen Adenoms

führen<sup>71</sup>. Eine Mutation des APC-Tumorsuppressorgens führt gewöhnlich zum Abbruch des codierten Proteins. Das führt zu einer gesteigerten Proliferation der Kolonepithelzelle und in der Folge zur Entwicklung eines frühen Adenoms. Untersuchungen an Patienten ohne FAP haben gezeigt, dass eine APC-Mutation bei 20-50 % aller kolorektalen Karzinome und bei etwa 30 % aller kolorektalen Adenome vorliegt<sup>79,99</sup>.

Zusätzlich tritt im Verlauf der Tumorgenese sehr früh ein signifikanter Verlust von Methylgruppen in der DNA auf. Bereits bei sehr kleinen Adenomen konnten bei etwa einem Drittel der untersuchten DNA-Bereiche Methylgruppenverluste nachgewiesen werden<sup>31</sup>. Diese Hypomethylierung kann zur Instabilität des Tumorzellgenoms beitragen und das Auftreten genetischer Veränderungen begünstigen.

Im weiteren Verlauf kommt es in einer der Adenomzellen zur Aktivierung des k-ras Onkogens auf Chromosom 12p. Diese k-ras Mutation kann in etwa 50 % aller kolorektalen Karzinome<sup>14,32</sup> und Adenome größer als 1 cm gefunden werden. In kleineren Adenomen hingegen werden weniger als 10 % k-ras Mutationen identifiziert<sup>99</sup>. Die Aktivierung eines solchen Onkogens durch Mutation bringt der Zelle einen Wachstumsvorteil, der es ihr erlaubt andere neoplastische Zellen zu überwuchern und zum dominierenden Zelltyp innerhalb des Tumors zu werden. Es entsteht ein größeres, unstrukturierteres Adenom. K-ras Mutationen können aber auch unabhängig von kolorektalen Neoplasien auftreten. Sie lassen sich beispielsweise in hyperplastischen, aberranten Krypten des Kolons<sup>107</sup> oder sogar in normal erscheinender Kolonschleimhaut nachweisen<sup>111</sup>.

Eine weitere Genmutation, diesmal auf dem DCC-Tumorsuppressorgen, führt in das Tumorstadium eines späten Adenoms. Hier treten bereits Übergänge in ein invasives Karzinom auf. Dieser DCC-Verlust lässt sich in mehr als 70 % aller kolorektalen Karzinome<sup>22,100</sup> und in fast 50 % der späten Adenome nachweisen<sup>99</sup>. Ein intaktes DCC-Tumorsuppressorgen codiert ein Protein mit Ähnlichkeit zu Zelladhäsionsmolekülen<sup>26</sup>. Ein Verlust dieses Proteins führt zu einer verminderten interzellulären Bindung der kolorektalen Epithelzellen und damit zu einem verstärkten Wachstumssignal.

Den letzten Schritt zur Entstehung eines invasiven Karzinoms bildet schließlich eine Mutation auf dem Tumorsuppressorgen p53. Diese p53-Mutation lässt sich in mehr als 70 % aller kolorektalen Karzinome finden<sup>22,99</sup>. Einen Hinweis für das späte Auftreten dieser Mutation in der Adenom-Karzinom-Sequenz liefert die Tatsache, dass sie in Adenomen unterschiedlicher Stadien kaum nachweisbar ist. Ein p53-Verlust tritt nicht nur bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen auf, auch eine Vielzahl anderer Tumoren sind mit diesem Tumorsuppressorgen assoziiert (siehe 1.5.).

Diese Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms ist nicht als statischer Prozess zu verstehen, vielmehr können jederzeit zusätzliche Mutationen auftreten, die neue Subpopulationen entstehen lassen. Diese können in der Tumormasse wieder untergehen oder bei beschleunigtem Wachstum an Größe zunehmen. Zusätzlich zu den oben genannten Chromosomen 5q, 12p, 18q, 17p können auch andere Chromosomen an der kolorektalen Tumorentstehung beteiligt sein. Eine breite Untersuchung kolorektaler Karzinome zeigte den Verlust von Regionen auf den Chromosomen 1q, 4p, 6p, 6q, 8p, 9q und 22q in 25-50 % der Fälle<sup>30</sup>. Auch die Reihenfolge der Mutationen wie in Abbildung 1 beschrieben ist nicht zwingend, obwohl sie in der Mehrzahl der Fälle gültig ist. Viel wichtiger für die Tumorgenese ist das Zusammenwirken der verschiedenen Mutationen. Dabei können schon zwei Mutationen für die Entwicklung eines Karzinoms ausreichen, es ist aber ebenfalls möglich, dass vier Mutationen nicht genügen um ein Karzinom entstehen zu lassen. Bei einer Untersuchung der vier oben genannten Gene APC, k-ras, DCC und p53 zeigte sich, dass zwei oder mehr dieser Mutationen in nur 7 % der frühen Adenome, 25 % der intermediären Adenome, 49 % der späten Adenome und in mehr als 90 % der Karzinome nachweisbar waren<sup>100</sup>. Die Entartung steigt also mit der Zahl der betroffenen Gene.

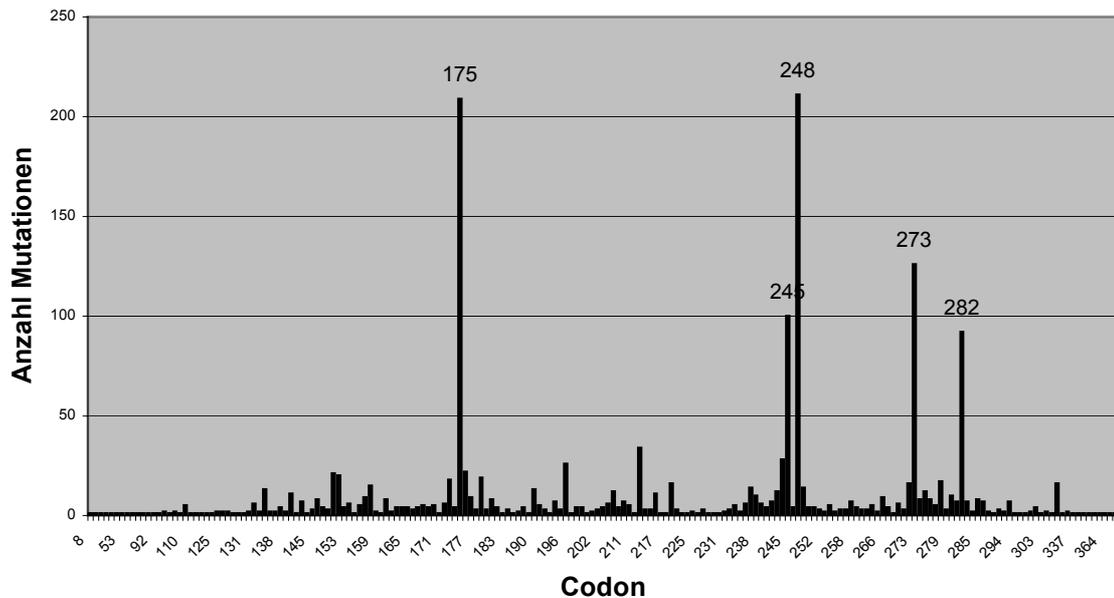
## **1.5. p53-Tumorsuppressorgen**

Das p53-Tumorsuppressorgen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17p und hat eine Länge von insgesamt 20303 bp. Die 11 Exons des Gens beinhalten 393 Codons, die ein nukleäres Phosphoprotein von 53000 Dalton codieren. Dieses Protein ist an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt und hilft die genetische Stabilität der Zelle aufrecht zu erhalten. Unter normalen Bedingungen liegt das Protein in sehr geringer Konzentration im Nucleus der Zelle vor<sup>88</sup> und spielt nur eine untergeordnete Rolle im Zellzyklus. Tritt aber ein physikalischer oder chemischer Schaden an der DNA auf, kann das intakte p53 entweder die Progression des Zellzyklus in der späten G1 Phase stoppen<sup>47,84</sup> um eine DNA Reparatur zu ermöglichen bevor eine Replikation stattfindet, oder die Apoptose der Zelle induzieren wenn eine Reparatur nicht möglich ist<sup>55,110</sup>. Um den Zellzyklus zu stoppen aktiviert das p53-Protein eine Reihe von Genen, die ebenfalls negative Wachstumseigenschaften besitzen<sup>69</sup>. Der Mechanismus der Apoptose durch p53 ist bisher ungeklärt. In Tumorzellen, in denen das p53-Gen beispielsweise durch Mutation fehlerhaft ist, sind die beschriebenen Mechanismen nicht funktionsfähig. Es kommt zu mangelhafter DNA Reparatur und in der Folge zu genetisch instabilen Zellen mit malignem Potential

<sup>54,109</sup>. Das kann auch erklären, warum Tumorzellen oft empfindlicher auf DNA-schädigende Substanzen wie Radio- oder Chemotherapie reagieren. Diese Empfindlichkeit kann ein positiver Nebeneffekt des Funktionsverlustes von p53 sein, das sonst den Zelltod hemmen würde <sup>101</sup>.

P53-Mutationen sind die am häufigsten vorkommenden Genmutationen in Malignomen des Menschen <sup>98</sup>. Diese Mutationen in den Codons des p53-Gens finden sich regelmäßig in Malignomen von Kolon, Lunge, Magen, Ösophagus, Brust, Leber, Haut, Ovarien, Gehirn, Prostata und Blase, sowie bei Lymphomen und Leukämie <sup>19</sup>. Es handelt sich dabei vorwiegend um Punktmutationen (ca. 95%) <sup>86</sup>, die zu einem Aminosäureaustausch in der Zentralregion des Proteins führen. Das Protein ist zwar stabil aber funktionsuntüchtig und akkumuliert im Nukleus der Tumorzelle <sup>25</sup>. Dieses Tumorsuppressorgen spielt also in der Tumorgenese verschiedenster Krebsarten eine wichtige Rolle. Dabei beschränkt sich der Grossteil der Mutationen auf bestimmte Exons. 98 % aller Mutationen finden sich auf den Codons 110 bis 307 <sup>45</sup>. Dieser Bereich entspricht hauptsächlich den Exons 5 bis 8. Mutationen außerhalb Exons 5 bis 8 sind selten <sup>9,20,64</sup>. Wenn man alle möglichen p53-Mutationen zusammen betrachtet, erkennt man außerdem, dass es bestimmte Codons gibt, die außergewöhnlich häufig betroffen sind, sogenannte „Hot-spots“. Dazu zählen die Codons 175, 248 und 273 (siehe Abbildung 2). Untersucht man die Mutationen unterschiedlicher Krebsarten, zeigen sich deutliche Unterschiede sowohl in der Position der Hot-spot Codons als auch in der Frequenz von Transitionen (Austausch eines Purins gegen ein Purin oder Pyrimidin gegen Pyrimidin) und Transversionen (Austausch eines Purins gegen ein Pyrimidin oder Pyrimidin gegen Purin). Transitionen dominieren in Kolon-, Gehirn- und Lymphmalignomen, wohingegen G:C zu T:A Transversionen häufig in Lungen- und Lebermalignomen zu finden sind.

Neben Punktmutationen des p53-Gens sind in menschlichen Tumoren auch Deletionen, Rearrangements und Allelverlust nachgewiesen worden <sup>17,58</sup>. Vor einiger Zeit war man noch der Ansicht, dass von Tumorsuppressorgen sowohl die väterliche als auch die mütterliche Kopie des Gens inaktiviert werden müsse, um die wachstumshemmende Funktion auszuschalten. Nun weiß man, dass sich p53-Genmutationen auf das Zellwachstum auswirken, auch wenn nur ein Allel hiervon betroffen ist <sup>29,44</sup>. Das heißt, auch unter Anwesenheit eines Wildtyp-Allels mit intaktem Genprodukt kann es zum Tumorwachstum kommen. Man nimmt an, dass das mutierte p53-Genprodukt an das Wildtyp-Genprodukt bindet und dabei dessen normale Funktion beeinträchtigt. Weiterhin kann man davon ausgehen, dass ein Verlust beider Allele zu einem aggressiveren Tumorwachstum führt <sup>48</sup>.



**Abbildung 2: Mutationshäufigkeit verschiedener Codons aus insgesamt 1635 Mutationen des p53-Gens bei kolorektalen Adenomen und Karzinomen <sup>86</sup>, besonders häufig auftretende Mutationen in den Hot-spot Codons 175, 245, 248, 273 und 282**

Ursachen für Mutationen des p53-Gens liegen sowohl in endogenen, als auch in exogenen Faktoren. Endogene Mutationen resultieren aus Fehlern, die während der vielfältigen biologischen Prozesse des DNA Metabolismus auftreten, wohingegen exogene Mutationen das Resultat unterschiedlicher Umwelteinflüsse sind. Beide Mechanismen haben typische Mutationsformen und -lokalisationen. So konnte bei p53-Mutationen ein direkter kausaler Effekt von ultravioletter Strahlung bei Hautkrebs, von Aflatoxin B1 bei Leberkrebs und von Zigarettenrauch bei Lungenkrebs nachgewiesen werden <sup>87</sup>. Das Spektrum dieser Mutationen kann zukünftig genutzt werden um die Ätiologie von Krebs zu erforschen.

Das p53-Tumorsuppressorgen spielt in der Adenom-Karzinom-Sequenz kolorektaler Tumoren eine bedeutende Rolle, da es von allen Genmutationen auch hier am häufigsten betroffen ist (siehe 1.4.). Der Nachweis dieser Mutation bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen korreliert mit einer kurzen Überlebenszeit und steht somit für eine schlechte Prognose <sup>38,66</sup>. 79 % aller p53-Mutationen bei kolorektalen Tumoren sind G:C zu A:T Transitionen und die meisten dieser treten an CpG Dinukleotiden auf <sup>8,45,75</sup>. DNA Methylierung führt, als kovalente Modifizierung von Cytosinresten in CpG Dinukleotiden, zu einer Verbindung von 5-Methylcytosin. Es wird angenommen, dass die Mutationsrate von CpG Dinukleotiden 10-40 fach höher liegt als die anderer Dinukleotide, und, dass die Ursache hierfür eine spontane Deaminierung von 5-Methylcytosin ist <sup>87</sup>. Mehr als die

Hälfte aller Transitionsmutationen bei kolorektalen Tumoren treten an den 3 CpG Hotspots auf (Codons 175, 248 und 273, Abbildung 2). Und mehr als 90 % der Mutationen in diesen Codons lassen sich mit der spontanen Deaminierung von 5-Methylcytosin in Verbindung bringen<sup>87</sup>. Das lässt vermuten, dass die meisten Mutationen, die das p53-Gen bei kolorektalen Tumoren verändern, Ursache dieses endogenen Prozesses sind und weniger Ursache einer exogenen Karzinogenexposition. G:C zu T:A Transversionen, Deletionen, Insertionen und Splice-Mutationen sind in kolorektalen Karzinomen sehr selten.

## **1.6. Screening-Methoden**

Da es keine zuverlässigen Frühsymptome für die Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom gibt, wird die Erkrankung oft zu spät erkannt. Wegweisend können Symptome wie Blutbeimengungen zum Stuhl, Änderung der Stuhlgewohnheiten, Leistungsminderung, Gewichtsabnahme und Fieber sein. Diese Symptome sind aber weder spezifisch noch sensitiv. Das hohe Risiko, besonders in den Industrienationen, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken verlangt also nach Screening-Methoden mit hoher Sensitivität und Spezifität für die breite Bevölkerung. Diese Screening-Methoden sollen außerdem kostengünstig und minimal invasiv sein, damit sie auf eine breite Akzeptanz stoßen. Die derzeit gängigen Methoden sind der Test auf okkultes Blut im Stuhl und die Koloskopie.

### **1.6.1. Fäkale okkulte Bluttestung (Haemoccult®-Test)**

Die jährliche Durchführung eines Tests auf okkultes fäkales Blut, bestehend aus drei Teststreifen für drei aufeinanderfolgende Stühle, wird ab dem 50. Lebensjahr bei allen asymptomatischen Personen empfohlen<sup>80</sup>. Der Haemoccult®-Test beruht auf der Peroxidaseaktivität des Hämoglobins und ist einfach und kostengünstig durchzuführen. Da zwei Drittel aller kolorektalen Karzinome im Verlauf einer Woche bluten, führt die regelmäßige Durchführung des Tests nachweislich zu einer Senkung der Mortalität durch kolorektale Karzinome<sup>2</sup>. Drei kürzlich abgeschlossene, randomisierte, kontrollierte Studien zeigten, dass diese Mortalitätssenkung bei nur 15-33 % nach 10-14 jähriger, regelmäßiger Anwendung liegt<sup>40,50,57</sup>. Das heißt 67-85 % der Patienten, die ohne diese Screening-Methode an einem kolorektalen Karzinom verstorben wären, erlitten auch unter kontrollierter Durchführung des Screenings dieses Schicksal.

Eine mangelhafte Sensitivität des Haemoccult®-Test lies sich auch anhand von Daten aus acht verschiedenen Studien aufzeigen<sup>5,10,23,46,73,74,76,104</sup>. Insgesamt waren nur 41 (26 %) von

159 kolorektalen Karzinomen und 36 (12 %) von 302 großen Adenomen Haemocult® positiv<sup>3</sup>. Die Spezifität des Haemocult®-Test liegt bei 90-95 %<sup>1,5,40,50,56,57</sup>. Es treten immer wieder falsch positive Testergebnisse auf. Die Ursache liegt vorwiegend in einer unzureichenden Aufklärung des Patienten vor der Testdurchführung in Bezug auf Ernährung und interferierende Medikamente. Rohes Fleisch und nicht-steroidale Antiphlogistika können zu falsch positiven Testergebnissen führen<sup>21</sup> und damit auch zu hohen Kosten im Gesundheitswesen durch überflüssige Koloskopien. Positive Testergebnisse können auch auf Magengeschwüre, Hämorrhoiden oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen zurückzuführen sein, sind also nicht spezifisch für kolorektale Adenome oder Karzinome.

### **1.6.2. Koloskopie**

Die komplette Koloskopie wird als der Goldstandard für das Auffinden von kolorektalen Adenomen und Karzinomen gesehen. Sie bietet als einziges Verfahren die Möglichkeit der Diagnose und endoskopischen Therapie, d.h. Abtragung von Polypen im gesamten Kolon. Die Darmschleimhaut lässt sich makroskopisch beurteilen und es können Probiopsien zur histologischen Klassifikation entnommen werden. Die Koloskopie wird ab dem 55. Lebensjahr bei allen asymptomatischen Personen empfohlen<sup>80</sup>. Eine Wiederholung in zehnjährigem Abstand ist ausreichend, da Schätzungen vermuten lassen, dass das Zeitintervall der Entwicklung eines Polypen zum Karzinom wenigstens zehn Jahre beträgt<sup>60,63,81,105</sup> und sowohl Sensitivität als auch Spezifität der Koloskopie hoch sind.

Trotzdem kommt es in etwa 15 % der Fälle zu einem falsch negativen Befund<sup>11,16,72</sup>. Weitere Nachteile liegen in einer, für den Patienten, unangenehmen, aufwendigen und invasiven Untersuchung. Die Einhaltung einer Diät und Abführen des gesamten Darminhalts vor der Koloskopie, sowie das Risiko einer Blutung, Infektion oder Perforation durch die Untersuchung verhindern eine breite Akzeptanz in der Bevölkerung. Zusätzlich entstehen durch eine Koloskopie hohe Kosten im Gesundheitswesen.

Eine weitere Alternative stellt die Sigmoidoskopie dar, die als Screening-Verfahren nachweislich zu einer Senkung der Mortalität des kolorektalen Karzinoms um etwa 60-80 % führt<sup>61,63,81</sup>. Sensitivität und Spezifität sind wie bei der Koloskopie hoch, allerdings ist sie der kompletten Koloskopie unterlegen, da die Sigmoidoskopie zusätzlich zu den schon genannten Nachteilen nur eine Beurteilung der distalen Darmabschnitte zulässt, aber Neoplasien von beispielsweise HNPCC-Patienten vorwiegend proximal lokalisiert sind.

## 2. Zielsetzung

Das hohe Risiko im Laufe des Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken und die steigende Inzidenz in den Industrienationen macht eine Verbesserung der bisher verwendeten Screening-Methoden notwendig. Die Entdeckung der genetischen Veränderungen während der Tumorgenese kolorektaler Tumoren lässt hoffen, dass eine Früherkennung dieser ersten Erkrankung über den Nachweis bestimmter Genmutationen im Stuhl möglich ist. Da die Zellen kolorektaler Tumoren zusammen mit dem Stuhl ausgeschieden werden, könnte die molekularbiologische Detektion von Mutationen auf Onkogenen und Tumorsuppressorgenen im Stuhl eine einfache Diagnose ermöglichen. Die theoretischen Vorteile lägen in einer nicht invasiven, risikolosen Untersuchung mit hoher Spezifität. Früher abgeschlossene Arbeiten zeigten, dass der Nachweis von Genmutationen im Stuhl zwar möglich, die Methoden aber aufwendig, kostenintensiv und verbesserungsfähig sind<sup>27,82,93</sup>.

Das Ziel dieser Arbeit war erstens, eine Methode zu optimieren, die den Nachweis von p53-Genmutationen in Kolonlavageproben auf einer einfachen und breiten Basis erlaubt. Ausgangspunkt hierfür war die „Single Strand Conformation Polymorphism“ – Analyse (SSCP-Analyse), die für diesen Zweck ideal erscheint, da mit ihr ein einfaches Screening ganzer Exons möglich ist. Zweitens sollte die Sensitivität dieser etablierten Methode ermittelt werden. Drittens sollte die Methode in einem Kollektiv von 38 Patienten getestet und das Ergebnis auf eine Korrelation zwischen dem Nachweis von Mutationen und bestimmten Patientencharakteristika untersucht werden.

Mit dieser etablierten Methode zum Nachweis von p53-Mutationen könnte, bei konsequenter Untersuchung der Lavageflüssigkeit, die bei Koloskopien anfällt, die Rate von 15 % falsch negativer Koloskopiebefunde gesenkt werden<sup>11,16,72</sup>. Außerdem könnte sich die Tumornachsorge durch engmaschige Kontrolle dieser Genmarker verbessern lassen. Theoretisch könnten damit sogar Malignome des Magens, des Pankreas oder der Gallenwege nachgewiesen werden, da sich Zellen des gesamten Gastrointestinaltraktes auch in der Kolonlavage wiederfinden könnten. Weiterhin könnte diese Methode auch bei der Entwicklung eines klinisch durchführbaren Stuhl-Screenings zur Früherkennung kolorektaler Tumoren verwendet werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Patientenkollektiv

An dieser Studie nahmen 38 Patienten teil. Bei jedem dieser Patienten wurde eine Koloskopie durchgeführt, bei der Kolonlavageflüssigkeit zur weiteren Untersuchung gesammelt wurde. Außerdem wurden während der Koloskopie Tumorbiopsien entnommen und durch das Institut für Pathologie am städtischen Krankenhaus München-Neuperlach histologisch klassifiziert. Falls bei Patienten eine operative Sanierung notwendig war, wurden hier zusätzlich die Tumorresektate histologisch klassifiziert.

Von den 38 Patienten waren 25 männlich und 13 weiblich. Das Durchschnittsalter lag bei 69,2 Jahren. 37 (97 %) Patienten waren an einem Adenokarzinom des Kolorektums erkrankt, bei einem dieser Patienten konnte ein Doppelkarzinom nachgewiesen werden. 28 (74 %) Patienten hatten zusätzlich zu dem Adenokarzinom weitere adenomatöse Polypen des Kolorektums. Bei einem Patienten (3 %) waren ein 3 cm großer, tubulo-villöser Polyp, sowie zwei adenomatöse Minipolypen ohne Malignität nachweisbar (Tabelle 2).

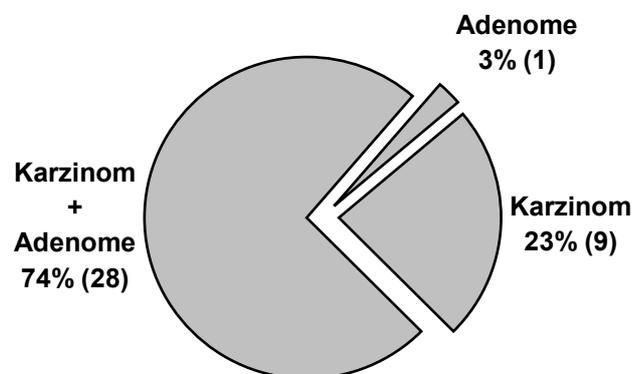


Abbildung 3: Verteilung der kolorektalen Adenom- bzw. Karzinomerkrankungen im Patientenkollektiv; n=38

Pat. Nr.	Geschlecht	Alter	Anzahl Adenome	Karzinom / Lokalisation	Karzinom Größe cm	Histologische TNM Klassifikation
2A	w	82	0	1 / S	1,2	pT1, L0, V0, G2, R0
3	m	71	1	1 / A	3,8	pT2, pN1, G2
3A	w	71	16 (6)	1 / R	2,6	pT2, pN1, G2, cM0, cR0
4	m	88	21 (2)	1 / S	1,5	pT1, V0, L0, G2
5	w	67	1 (1)	1 / A	1,6	pT3, pN1, pM1, G2, R0
6	w	63	2	1 / T	4,7	pT3, pN0, G3, cM0, cR0
10A	w	51	3 (1)	0		Nur Adenome
13	m	76	0	1 / T	5,0	G2
14	m	62	3 (2)	1 / S	2,2	pT2, pN0, G1, cR0, cM0
18A	m	65	4	1 / S	1,4	pT1, R1, G2
23	w	81	7	1 / S	2,5	pT2, pN0, G2
24A	m	85	0	1 / S	4,9	pT3, pN0, cM0, G2, R0
28	w	79	1	1 / R	3,3	pT3, pN0, cM0, cR0, G2
29	m	56	24 (3)	1 / D	2,5	pT2, pN0, cM0, R0, G2
30A	m	76	0	1 / A	5,0	pT1, G2, pN0
34	m	51	1	1 / R	2,0	pT1, G2, pN0
35A	m	94	1	1 / R	10,0	G2
38	m	79	2	1 / T	2,8	pT3, pN0, cM0, cR0, G2
45	w	62	1	1 / S	2,0	pT1, V0, L0, R0, G1
46	w	74	21 (7)	2 / TT	2,5	pT3, pN1, cM0, cR0, G2
46A	m	51	5	1 / S	5,0	pT4, pN1, cM1, G2, R2
47A	m	66	2	1 / R	4,5	pT3, pN2, cM1, G2, L1, R2
51	m	87	2	1 / R	3,3	pT3, pN2, pM1, cR2, G2
54	m	60	1	1 / A	2,7	pT1, G2, pN0, R0
54A	w	52	2	1 / R	5,0	G2
58A	m	65	20 (2)	1 / R	6,0	pT2, pN0, G2, cM0, R0
59A	w	72	3	1 / S	2,3	pT3, pN1, cM0, cR0, G2
60A	m	73	8	1 / R	7,5	pT2, pN0, MX, G2
64A	w	70	3 (1)	1 / T	4,2	pT3, pN0, G2, R0
65	m	52	3 (1)	1 / S	2,0	pT1, pN0, G2, R0
67	m	61	0	1 / T	3,0	pT3, pN2, cM1, G3, R2
68A	m	62	0	1 / R	3,0	pT3, pN0, cM0, G2, R0
71A	m	84	2	1 / R	5,0	pT3, pN1, G2
75A	w	51	0	1 / R	3,6	pT1, G2, V0, L0
88A	m	82	0	1 / S	3,0	pT4, pN2, cM1, G2, V1, R2
96A	m	70	4 (1)	1 / R	4,5	pT3, pN2, G2, R0
97A	m	63	0	1 / R	1,0	pT1, pN0, cM0, cR0, G2
104A	m	77	3	1 / T	4,9	pT3, pN0, G2

**Tabelle 2: Patientenkollektiv; Anzahl der Adenome > 1 cm i.D. in Klammern; A=Colon ascendens, T=C. transversum, D=C. descendens, S=C. sigmoideum, R=Rectum; Karzinomgröße=mittlerer Durchmesser in cm; Entsprechend der TNM-Klassifikation: T=Ausdehnung des Primärtumors, N=Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung, M=Fehlende oder vorhandene Fernmetastasen, X=Kann nicht beurteilt werden, G=Histopathologisches Grading, V=Einbruch in die Venen, L=Einbruch in das Lymphsystem, R=Resektionsgrenzen, p=Postoperativ, c=Befundsicherung**

### 3.2. DNA Extraktion aus Lavageproben

Die Kolonlavageproben wurden mit dem Einverständnis der Patienten im städtischen Krankenhaus München-Neuperlach gesammelt. Zur Darmentleerung nahmen die Patienten einen Tag vor der Koloskopie ein Laxans, am Tag der Koloskopie 2 bis 3 Liter Polyethylen-Glykol-haltige Lösung ein. Die im Kolon verbliebene Lavagelösung wurde dann während der Koloskopie in sterile Behälter abgesaugt (250 bis 700 ml). Alle Endoskope (CF-Q 140 I, PCF-20, CF-30 I; Olympus) waren gereinigt und von Chemikalien befreit um verfälschende Einflüsse auszuschließen. Alle Proben und Daten wurden anonymisiert.

Sofort nach Entnahme wurde die Lavageflüssigkeit bei  $2.700 \times g$  5 Minuten zentrifugiert und der zellfreie Überstand verworfen. Dann wurde das Sediment mit PBS-Puffer (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 1000 ml Aqua destillata, pH 7,3-7,4) gewaschen, zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Um die Reinheit der DNA zu erhöhen wurde dieser Vorgang 3 mal wiederholt, bis der Überstand klar war. Dann konnten die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

Die Extraktion und Reinigung der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen QIAmp DNA Mini Kit der Firma QIAGEN. In mehreren Schritten erfolgte hierbei die Lyse der Zellmembran, Inaktivierung der Nuklease und Trennung der DNA von den übrigen Zellbestandteilen. Dem entsprechenden Protokoll des Kits folgend (Tissue Protocol, QIAGEN), wurden zunächst 200  $\mu\text{l}$  des Sediments mit 180  $\mu\text{l}$  des ATL-Puffers und 30  $\mu\text{l}$  Proteinase K gemischt und bei  $56^\circ\text{C}$  2 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  AL-Puffer wurde die Probe erneut gemischt und bei  $70^\circ\text{C}$  10 Minuten inkubiert. Dann wurde die Lösung mit 200  $\mu\text{l}$  96-100 %igem Ethanol vermengt und einer QIAmp Säule mit einer Silica-Gel-Matrix zugeführt. Es folgte eine Zentrifugierung bei  $6.000 \times g$  für 1 Minute. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  AW1-Puffer erneut zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde mit 500  $\mu\text{l}$  AW2-Puffer wiederholt, allerdings bei  $20.000 \times g$  für 3 Minuten. Schließlich wurde die DNA nach einer Inkubationszeit von ca. 5 Minuten mit 200  $\mu\text{l}$  AE-Puffer bei  $6.000 \times g$  1 Minute lang von der Säule eluiert. Bis zur weiteren Verarbeitung konnten die gewonnenen DNA-Proben bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

### 3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die extrahierte DNA wurde mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Da Mutationen des p53 Gens am häufigsten in den Exons 5 bis 8 auftreten, wurden entsprechende Primer für diese Exons ausgewählt (Tabelle 3). Exon 5 wurde mit den Primern 5.1.1. und 5.2.2., Exon 6 mit den Primern 6.1. und 6.2., Exon 7 mit den Primern 7.1. und 7.2. und Exon 8 mit dem Primern 8.1. und 8.2. amplifiziert. Exon 5 nahm hier eine Sonderrolle ein: Wie man Tabelle 4 entnehmen kann ist Exon 5 mit 205 bp deutlich länger als die anderen Exons. Für eine SSCP-Analyse verwendet man kurze Fragmente, denn eine Punktmutation verändert die Konformation eines Einzelstranges umso stärker, je kürzer der Strang ist. 205 bp sind für eine SSCP-Analyse zwar nicht zu lang, eine Mutation in Codon 132 (BT-20) lies sich jedoch in der Analyse des gesamten Exons 5 nicht nachweisen. Deshalb wurde mit den Primern 5.1.1. und 5.1.2. zusätzlich noch die erste Hälfte des Exons 5 (Codon 126 bis 163) amplifiziert.

Neben der DNA aus den Kolonlavageproben wurde sowohl die DNA von Zelllinien (BT-20, Kle-1B, HaCat, Hut 78, Hec-1B, SW 480), als auch Wildtyp-DNA aus Leukozyten unter den gleichen Bedingungen amplifiziert. Die Zelllinien dienten in der SSCP-Analyse als positiv Kontrolle mit bekannten Mutationen in einem entsprechenden Codon (siehe 3.6. und Tabelle 4), die Wildtyp-DNA diente als negativ Kontrolle.

Primer	Sequenz	Länge
5.1.1.	5' - TTCCTCTTCCTGCAGTACTCCCCTGCCCTC	30 b
5.1.2.	5' - GTAGATGGCCATGGCGCGGACG	22 b
5.2.2.	5' - GTCACCATCGCTATCTGAGC	21 b
6.1.	5' - GATTGCTCTTAGGTCTGGCCCCTCCTCAGC	30 b
6.2.	5' - CAGACCTCAGGCGGCTCATAGG	22 b
7.1.	5' - CTAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCC	29 b
7.2.	5' - TGACCTGGAGTCTTCCAGTGTG	22 b
8.1.	5' - GTAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGC	29 b
8.2.	5' - CTCGCTTAGTGCTCCCTGGGGGC	23 b

**Tabelle 3: Primer p53 – Exons 5-8**

Exon	Primer	Codons	Länge	Zelllinien	Mutiertes Codon	Häufigkeit % *
5.1.	5.1.1. - 5.1.2.	126 - 163	129 bp	BT-20	132	0,4
5	5.1.1. - 5.2.2.	126 - 186	205 bp	Kle-1B	175	12,8
				HaCat	179	1,2
				BT-20	132	0,4
6	6.1. - 6.2.	187 - 224	130 bp	Hut 78	196	1,6
7	7.1. - 7.2.	225 - 261	118 bp	Hec-1B	248	12,9
8	8.1. - 8.2.	262 - 306	141 bp	SW 480	273	7,7
				HaCat	282	5,6

**Tabelle 4: Übersicht Exons 5-8 / Zelllinien; \* absolute Häufigkeit des mutierten Codons aus insgesamt 1635 nachgewiesenen Mutationen des p53-Gens bei kolorektalen Tumoren <sup>86</sup>**

Die PCR wurde nach einem Standardprotokoll mit HotStarTaq DNA Polymerase (Firma QIAGEN) durchgeführt. Der Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

- 200 µM dNTP-Mix (Firma SIGMA; je 200µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- je 0,25 µM der beiden Primer
- 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2,5 Units HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN)
- PCR-Reaktionspuffer aus Tris-HCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,7 (QIAGEN)

Als letztes wurden ≤ 1µg (circa 300 ng bis 900 ng) der extrahierten Lavage-DNA bzw. Zelllinien- oder Wildtyp-DNA pro Ansatz zugegeben. Um diese Menge zu bestimmen wurde die DNA-Konzentration zuvor mit einem Photometer gemessen. Eine Kontaminationsprüfung durch negative Kontrollen erfolgte bei jedem PCR-Ansatz.

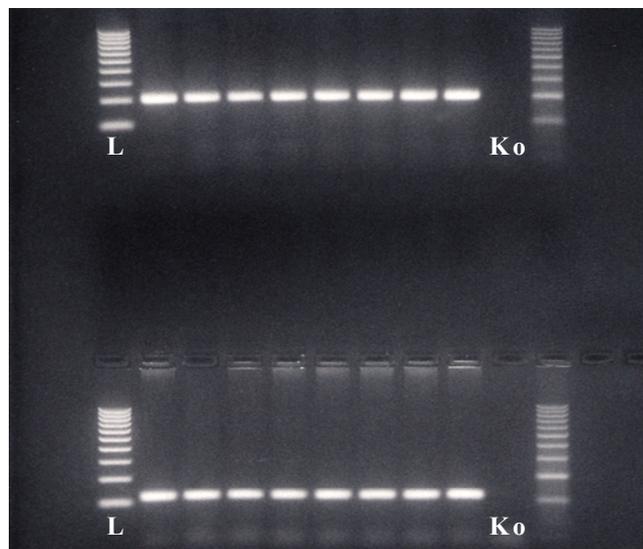
Die PCR wurde mit Hilfe eines vollautomatischen Thermocyclers (Firma BIOMETRA) durchgeführt. Nach einer initialen Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN) bei 95 °C für 15 Minuten schlossen sich 40 Zyklen der folgenden 3 Schritte an (Tabelle 5): Denaturierung des Doppelstranges 30 Sekunden bei 94 °C, Hybridisierung der Oligonukleotidprimer 30 Sekunden bei 63 °C und Polymerisation 30 Sekunden bei 72 °C. Eine letzte Polymerisation fand 10 Minuten bei 72 °C statt. Anschließend wurden die PCR-Produkte sofort auf 4 °C gekühlt.

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1) Initiale Aktivierung	95 °C	15 min	1
2) Denaturierung	94 °C	30 sec	40
3) Hybridisierung	63 °C	30 sec	
4) Polymerisation	72 °C	30 sec	
5) Finale Polymerisation	72 °C	10 min	1

**Tabelle 5: PCR Protokoll**

### 3.4. Agarosegel-Elektrophorese

Zur Kontrolle der Amplifikation wurden die PCR-Produkte durch eine Agarosegel-Elektrophorese dargestellt. Hierzu wurden 4 g Agarosepulver Typ I-A (SIGMA) abgewogen und in 200 ml TBE-Puffer (0,089 mM Tris, 0,089 mM Borsäure, 0,002 mM Titriplex III) gelöst. Das ergibt eine Agarosekonzentration von 2 %. Ein Mikrowellengerät kochte die Lösung dann cirka 5 Minuten bei 600 W. Nach dem Erhitzen wurde der Lösung 1,5 µl Ethidiumbromid zugesetzt, ein fluoreszierender Farbstoff, der mit den DNA-Strängen interagiert. Nach Verfestigung des Gels wurden 18 µl eines PCR-Produkt-Gemisches, bestehend aus 10 µl PCR-Produkt, 4 µl konzentriertem DNA-Auftragspuffer und 4 µl Aqua, aufgetragen. Zusätzlich liefen 18 µl einer 100 bp DNA-Leiter (Firma BMA), mit der man die Länge der amplifizierten PCR-Produkte vergleichen konnte. In einem TBE-Puffer-Bad mit gleicher Ethidiumbromidkonzentration, lief die Elektrophorese 60 Minuten bei konstant 100 V. Mit Hilfe einer UV-Lampe stellten sich die PCR-Produkte dann als Ethidiumbromid-gefärbte Banden dar. So war es möglich sowohl die Länge als auch die Menge der amplifizierten DNA-Stücke abzuschätzen und Unregelmäßigkeiten der PCR aufzudecken (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte von Exon 5 (205 bp, oben) und Exon 7 (118 bp, unten), Ko = negative Kontrolle; L = 100 bp Leiter**

### **3.5. Reinigung der PCR-Produkte**

Um die Entstehung zahlreicher unspezifischer Banden in der SSCP-Analyse zu vermeiden, wurden alle PCR-Produkte gereinigt. Die Reinigung wurde nach einem Standardprotokoll mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) durchgeführt und ermöglicht die Entfernung von Oligonukleotiden (Primern) bis zu einer Länge von 40 bp sowie die Entfernung von Salzen ( $MgCl_2$ , KCl), Enzymen (Polymerase) und einzelnen Nukleotiden aus dem PCR-Produkt. DNA-Fragmente zwischen 100 bp und 10 kb bleiben von der Reinigung unangetastet.

Zunächst wurden Binding Buffer (QIAGEN) und 50 µl bis 90 µl des verbleibenden PCR-Produkts im Volumenverhältnis 5 zu 1 gemischt und einer Säule mit einer Silica-Gel-Matrix zugeführt. Dieses Gefäß wurde bei  $10.000 \times g$  2 Minuten zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die, nun an die Matrix gebundenen, DNA-Fragmente wurden nach Zusatz von 750 µl Washing Buffer (QIAGEN) erneut zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Eine weitere Zentrifugation von 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit gewährleistete, dass jegliche Pufferreste entfernt waren, bevor die gereinigte DNA mit 30 µl Elution Buffer (QIAGEN) eluiert wurde. Durch die, im Verhältnis, geringere Elutionsmenge, lag das PCR-Produkt dann in etwa 2- bis 3-fach konzentrierter Lösung vor.

### **3.6. SSCP-Elektrophorese**

Das Prinzip der „Single Strand Conformation Polymorphism“ – Analyse (SSCP-Analyse) beruht auf der unterschiedlichen Mobilität von DNA-Einzelsträngen aufgrund von Konformationsunterschieden.

Es ist möglich DNA-Doppelstränge durch Hitzedenaturierung zu trennen. Werden diese Einzelstränge dann schnell abgekühlt und auf ein nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen, bilden sie intramolekulare Basenpaare aus und nehmen eine stabile Einzelstrangkongformation an. Da sich die beiden Stränge eines solchen Doppelstranges in ihren Sequenzen normalerweise sehr unterscheiden, haben beide Moleküle jeweils eine unterschiedliche dreidimensionale Konformation. Das führt zu unterschiedlichen Mobilitäten in dem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel, so dass man im Allgemeinen zwei Banden erkennt. Schon eine Punktmutation kann zu einer Konformationsänderung führen und damit eine Änderung der Laufgeschwindigkeit des Einzelstranges bedingen<sup>62,67</sup>. So ist es möglich DNA-Stränge mit einer Mutation in ihrer Sequenz, im Vergleich zur Wildtyp-DNA, durch eine Bandenverschiebung aufzufinden (Abbildung 5).

Für vorliegende Arbeit wurde keine klassische vertikale SSCP-Analyse, sondern eine horizontale SSCP-Analyse ausgewählt. Diese erfolgte mit Hilfe des GeneGel SSCP Starter Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Für die optimale Analyse der p53 Mutationen mussten, für jedes Exon getrennt, bestmögliche Bedingungen geschaffen werden. Zunächst war es wichtig für jedes Exon den optimalen Puffer zu bestimmen. Es standen Puffer A mit pH 9,0, Puffer B mit pH 7,4 und Puffer C mit pH 8,3 zur Auswahl. Darauf folgte die Analyse der optimalen Elektrophoretetemperatur bei 5 °C, 12 °C oder 20°C. Zusätzlich war es möglich zwischen einem GeneGel SSCP Gel und einem GeneGel Clean 15/24 Gel zu wählen. Für diese Etablierung wurden gereinigte PCR-Produkte von Zelllinien mit bekannten Mutationen in den entsprechenden Exons verwendet (positiv Kontrolle, Tabelle 4) und mit gereinigten PCR-Produkten von Wildtyp-DNA aus Leukozyten (negativ Kontrolle) verglichen. Auf diese Weise war gewährleistet, dass häufig auftretende Mutationen des p53 Gens, sogenannte Hot-spots, in der SSCP-Analyse deutlich hervortreten. Die optimalen Bedingungen für jedes Exon, die die Unterschiede zwischen Wildtyp und mutierter Zelllinie am Besten hervorbringen, zeigt Tabelle 6.

Exon	Puffer	Temperatur	Gel
5.1.	A	12 °C	GeneGel Clean 15/24
5	B	12 °C	GeneGel SSCP
6	C	5° C	GeneGel SSCP
7	C	12 °C	GeneGel SSCP
8	A	12 °C	GeneGel Clean 15/24

**Tabelle 6: Optimierte Bedingungen für die SSCP-Analyse der Exons 5.1. bis 8**

Jede SSCP-Analyse wurde nach folgendem Standardprotokoll (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt: Zunächst wurde das gereinigte PCR-Produkt im Verhältnis 1 zu 1 mit Probenpuffer (4,75 ml Formamid, 0,125 ml 1 % Xylen Cyanol Lösung, 0,125 ml 1 % Bromphenolblau Lösung) gemischt, dann 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und sofort danach in einem Eiswasserbad schockgekühlt. Das entsprechende Gel wurde in einem der Puffer für 60 Minuten mit Hilfe eines Schüttlers rehydriert, dann sorgfältig abgetrocknet und auf die temperierte Elektrophoreseeinheit (GenePhor Electrophoresis Unit) gelegt. 2 Elektrodenstreifen wurden mit je 6 ml entsprechendem Elektrodenpuffer A, B oder C befeuchtet. Die Auftragsmenge der Proben betrug 6 µl pro Tasche, außerdem lief eine 100 bp Leiter (BMA), sowie eine positiv- und eine negativ Kontrolle bei jeder Elektrophorese mit. Die Elektrophoresebedingungen der verschiedenen Puffer zeigt Tabelle 7.

Puffer	Phase	Max. Spannung	Max. Ampere	Max. Watt	Zeit
A	1	90 V	6 mA	5 W	25 min
	2	500 V	14 mA	10 W	50 min
B	1	170 V	10 mA	5 W	15 min
	2	310 V	15 mA	5 W	45 min
	3	380 V	15 mA	5 W	60 min
C	1	80 V	5 mA	5 W	20 min
	2	510 V	15 mA	10 W	60 min

**Tabelle 7: SSCP Elektrophoresebedingungen**

### 3.7. Silberfärbung

Das SSCP-Gel wurde sofort nach Beendigung der Elektrophorese mit Hilfe eines DNA Silver Staining Kit (Pharmacia Biotech) gefärbt. Das Protokoll folgte dabei 5 Schritten:

- Fixierung 30 Minuten mit 3 % Benzolsulfonsäure, 24 % Ethanol
- Silberfärbung 30 Minuten mit 1 % Silbernitrat, 0,35 % Benzolsulfonsäure
- Waschen 1 Minute mit Aqua
- Entwicklung 6 Minuten mit Natriumcarbonat 12,5 %, Formaldehyd 37 %, Natriumthiosulfat 2 %
- Stoppen und Konservierung 30 Minuten mit Essigsäure 5 %, Glycerol 50 %, Natriumacetat 25 %

Nach der Färbung waren die DNA-Banden deutlich sichtbar und das SSCP-Gel wurde in weißem Licht fotografiert.

### 3.8. Sequenzierung

Die Proben von 10 ausgewählten Patienten wurden durch die Firma Sequiserve (Vaterstetten bei München) sequenziert. Sequiserve erhielt für die Sequenzierung fertige PCR-Produkte der Kolonlavageproben mit DNA-Konzentrationen zwischen 107 und 212 ng/ $\mu$ l. Da für eine Sequenzierung längere DNA-Abschnitte besser geeignet sind, wurden hier teilweise andere Primer verwendet (Tabelle 8). Die Primer p53/5+6-5' und p53/5+6-3' amplifizierten ein 578 bp langes DNA-Stück, das die Exons 5 und 6 beinhaltet. Die Primer p53/7+8-5' und p53-5-9-3' amplifizierten ein 865 bp langes DNA-Stück, das die Exons 7 und 8 beinhaltet. Eine Ausnahme bildeten die Proben der Patienten 2A, Exon 5 und 75 A, Exon 7 und Exon 8. Da hier nur eine geringe Menge der Kolonlavage-DNA zur Verfügung stand, wurde auf bereits fertige Amplifikate zurückgegriffen (siehe Tabelle 9). Außerdem erhielt Sequiserve wegen der Länge der Amplifikate vier interne Primer.

Primer	Sequenz	Länge
p53/5+6-5'	5' - TCTAGCTCGCTAGTGGGTTGC	21 b
p53/5+6-3'	5' - CCTACTGCTCACCCGGAGG	19 b
p53/7+8-5'	5' - TCTCCCCAAGGCGCACTGG	19 b
p53-5-9-3'	5' - ACGGCATTTTGAGTGTTAGACTGG	24 b
p53e5-6inF	5' - GAGAGACGACAGGGCTGGTTGCCAG	26 b
p53e5-6inR	5' - CTGGGCAACCAGCCCTGTCGTCTCTC	26 b
p53e7-9inF	5' - GACAAGGGTGGTTGGGAGTAGATGGAGCCTGG	32 b
p53e7-9inR	5' - CCAGGCTCCATCTACTCCCAACCACCCTTGTC	32 b

**Tabelle 8: Primer p53 - Sequenzierung**

Patient Nr.	Primer	Exon	Codons	Länge
2A	5.1.1. – 5.2.2.	5	126 - 186	205 bp
3	p53/5+6-5' – p53/5+6-3'	5 und 6	126 - 224	578 bp
10A	p53e5-6inF			
13	p53e5-6inR			
18A				
29				
47A				
51				
71A	p53/7+8-5' – p53-5-9-3' p53e7-9inF p53e7-9inR	7 und 8	225 - 306	865 bp
75A	p53/5+6-5' – p53/5+6-3' p53e5-6inF p53e5-6inR	5 und 6	126 - 224	578 bp
	7.1. – 7.2.	7	225 - 261	118 bp
	8.1. – 8.2.	8	262 - 306	141 bp

**Tabelle 9: Sequenzierung der DNA von 10 Patienten**

Die Amplifikation für die Sequenzierung erfolgte mittels zwei aufeinanderfolgender PCR-Reaktionen. Dabei folgte die erste PCR dem Protokoll wie bereits in 3.3. beschrieben. Die einzigen Ausnahmen bildeten dabei die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer, die bei einer Annealingtemperatur von 65 °C durchgeführt wurde, die Polymerisation, die 60 Sekunden dauerte und die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 2,0 mM. Im zweiten Schritt wurde eine Re-PCR mit den Produkten aus der ersten PCR durchgeführt. Die Zyklenzahl von Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation betrug bei der Re-PCR 35 (Tabelle 10), lief sonst aber unter gleichen Bedingungen ab wie die vorangegangene PCR.

Nach jeder PCR wurde zur Kontrolle der Produkte eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt, wie unter 3.4. beschrieben. Am Ende folgte eine Reinigung mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, siehe 3.5.). Bis zur eigentlichen Sequenzierung wurden die gereinigten Amplifikate bei –20 °C gelagert.

	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
1) Initiale Aktivierung	95 °C	15 min	1
2) Denaturierung	94 °C	30 sec	35
3) Hybridisierung	65 °C	30 sec	
4) Polymerisation	72 °C	60 sec	
5) Finale Polymerisation	72 °C	10 min	1

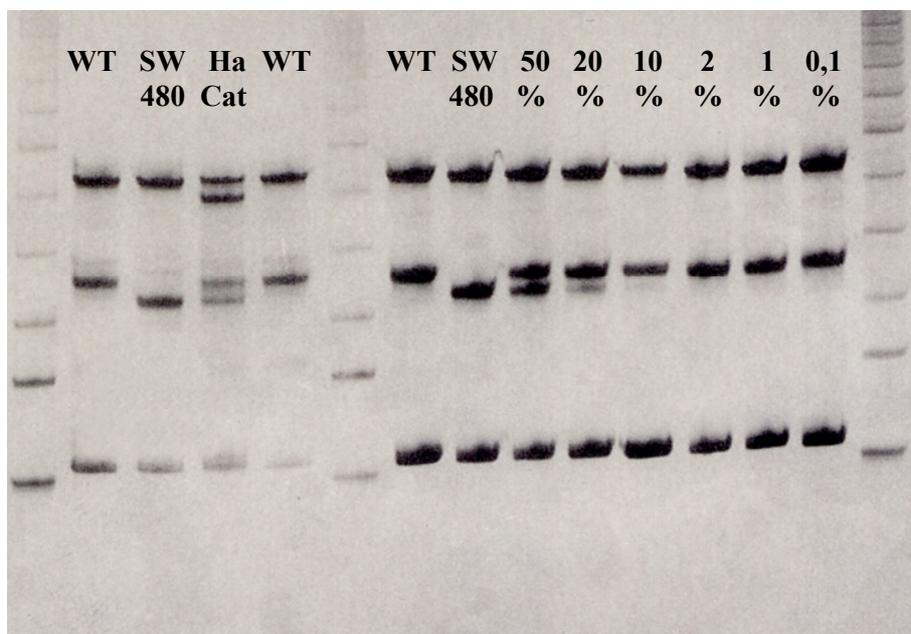
**Tabelle 10: Protokoll der Re-PCR für die Sequenzierung**

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Sensitivität der Methode

Die Extraktion der DNA aus den Kolonlavageproben konnte mit oben beschriebener Methode problemlos durchgeführt werden. Alle PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegel-Elektrophorese dargestellt und waren von zufriedenstellender Qualität. Die anschließende Reinigung sorgte für klare Banden in der SSCP-Analyse.

Alle 8 Mutationen, der für Etablierung und positiv Kontrolle verwendeten Zelllinien, ließen sich in der SSCP-Analyse zweifelsfrei nachweisen. Dabei konnte man insbesondere die Banden von Wildtyp und den Mutationen in den Hot-spot Codons 175, 248 und 273 (Zelllinien Kle-1B, Hec-1B und SW480) deutlich unterscheiden. Durch Austestung sequenzieller Verdünnungsreihen mutierter DNA (aus Zelllinien) in Wildtyp-DNA (aus Leukozyten) konnte gezeigt werden, dass ein Anteil von  $\geq 20\%$  mutierter DNA in der Wildtyp-DNA nötig ist, um die Mutation in der SSCP-Analyse nachzuweisen (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5:** SSCP-Analyse Exon 8; WT = Wildtyp; links: Vergleich WT – Zelllinie SW 480 und HaCat; rechts: Verdünnungsreihe mit abnehmender SW480 Konzentration in der Wildtyp-DNA

## 4.2. Ergebnisse der SSCP-Analyse

Die Kolonlavage von 38 Patienten wurde untersucht. Bei 9 Patienten (24 %) wurde eine p53-Mutation durch die SSCP-Analyse nachgewiesen (Tabelle 11). Davon befanden sich sechs Mutationen in Exon 5, zwei Mutationen in Exon 6 und eine Mutation in Exon 7. Durch Vergleich der Bandenverschiebungen mit den Banden der mutierten Zelllinien konnte in 7 der 9 Fälle (78 %) das mutierte Codon identifiziert werden. In 2 Fällen handelte es sich um 2 gleichartige, unbekannte Bandenverschiebungen (siehe Abbildung 9). Das hier betroffene Codon 213 konnte später durch die Sequenzanalyse bestimmt werden. Bei den 9 nachgewiesenen Mutationen handelte es sich in 6 Fällen (67 %) um Hot-spot Codons (5 x Codon 175 und 1 x Codon 248).

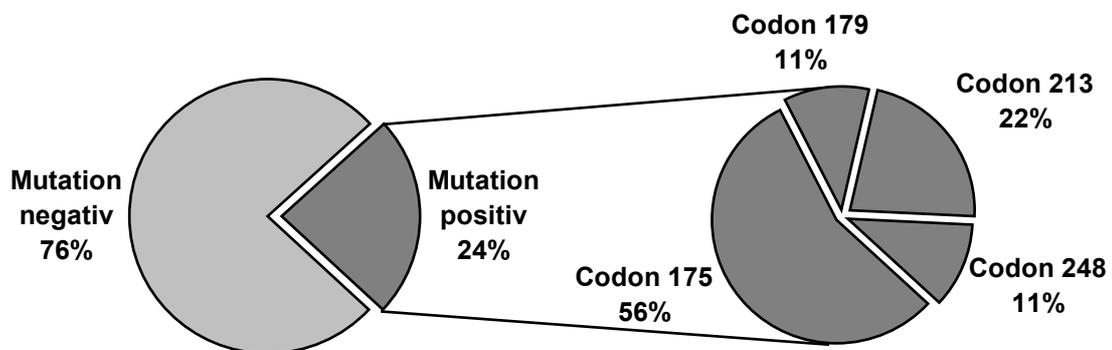
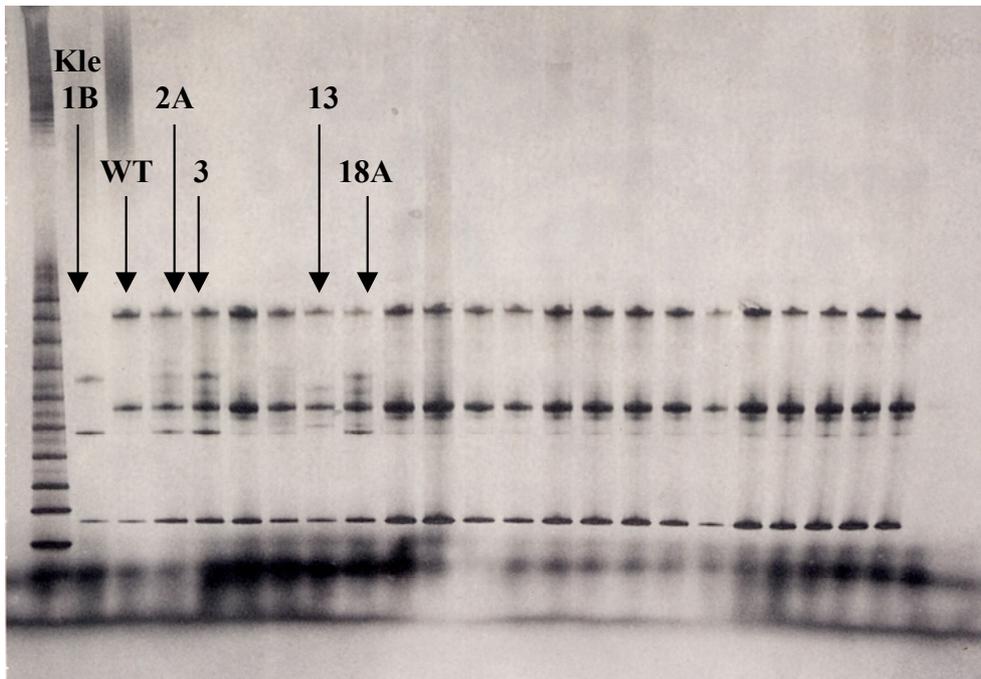


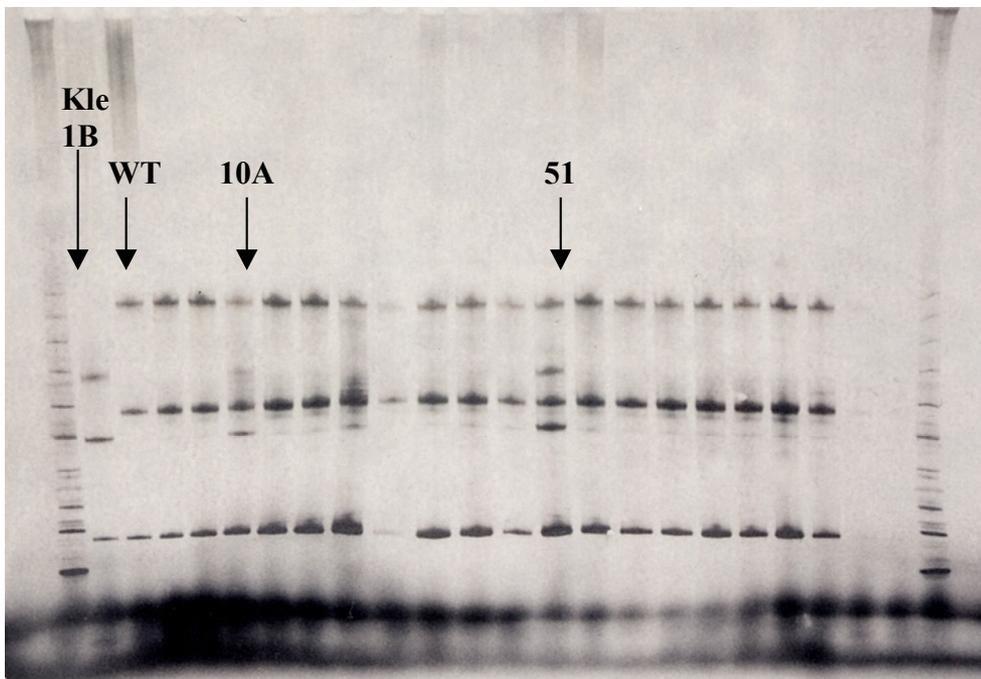
Abbildung 6: links: Anteil der Mutationen im Patientenkollektiv n=38;  
rechts: Verteilung der mutierten Codons n=9

Patient Nr.	Mutation	Bandenverlauf gleich Zelllinie	Mutiertes Codon	Anzahl	%
2A	Exon 5	Kle-1B	175	5	56
3					
10A					
18A					
51					
13		HaCat	179	1	11
29	Exon 6	Unbekannt	213 (siehe 4.2. Sequenzierung)	2	22
47A					
71A	Exon 7	Hec-1B	248	1	11

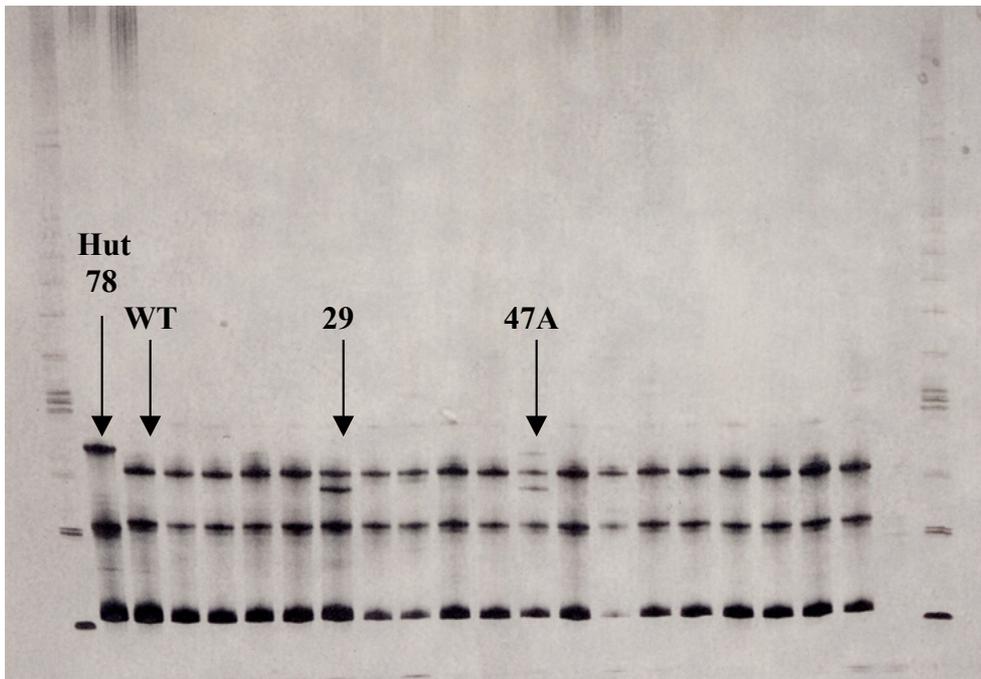
Tabelle 11: Ergebnisse der SSCP-Analyse



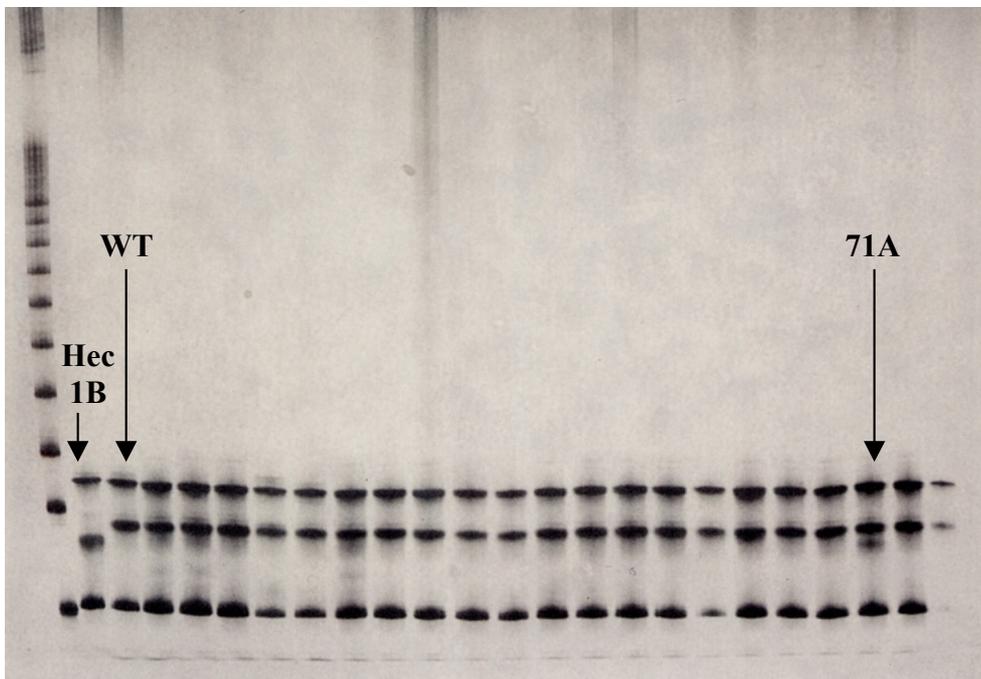
**Abbildung 7: SSCP-Analyse Exon 5; Zelllinie Kle-1B, WT = Wildtyp, Kle-1B ähnliche Banden bei Patienten 2A, 3 und 18A, HaCat ähnliche Banden bei Patient 13**



**Abbildung 8: SSCP-Analyse Exon 5; Zelllinie Kle-1B, WT = Wildtyp, Kle-1B ähnliche Banden bei Patienten 10A und 51**



**Abbildung 9: SSCP-Analyse Exon 6; Zelllinie Hut 78, WT = Wildtyp und atypische Banden bei Patienten 29 und 47A**



**Abbildung 10: SSCP-Analyse Exon 7; Zelllinie Hec-1B, WT = Wildtyp, Hec-1B ähnliche Banden bei Patient 71A**

### 4.3. Ergebnisse der Sequenzierung

Um die Ergebnisse der SSCP-Analyse zu bestätigen, wurden die Proben von 10 Patienten sequenziert. 9 von diesen Patienten zeigten bereits in der SSCP-Analyse eine Mutation. Bei diesen 9 Patienten konnte durch die Sequenzierung in 4 Fällen (44 %) eine Punktmutation nachgewiesen werden. In allen 4 Fällen stimmte das betroffene Codon mit dem Ergebnis der SSCP-Analyse überein. Ein Patient (75A) zeigte in allen Exons der SSCP-Analyse keine Bandenverschiebung und wurde als negative Kontrolle sequenziert. Dieser Patient wies auch in der Sequenzanalyse keine Mutation auf.

- Patient 2A, Codon 175: CGC (=Arginin) zu CAC (=Histidin)
- Patient 10A, Codon 175: CGC (=Arginin) zu CAC (=Histidin)
- Patient 51, Codon 175: CGC (=Arginin) zu CAC (=Histidin)
- Patient 29, Codon 213 : CGA (=Arginin) zu CGG (=Arginin)

Bei 3 Patienten handelte es sich um eine Änderung der Aminosäuresequenz durch eine G:C zu A:T Transition im Hot-spot Codon 175. Ein Patient hatte eine A:T zu G:C Transition in Codon 213 ohne Änderung der Aminosäure.

### 4.4. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei 8 (22 %) der 37 Karzinompatienten wurden p53-Mutationen in den Kolonlavageproben nachgewiesen. Alle 8 waren an einem mäßig differenzierten Adenokarzinom des Kolorektums erkrankt. Bei einem Patienten mit einem 3 cm großen, tubulo-villösen Polyp, sowie zwei adenomatösen Minipolypen ohne nachweisbare Malignität trat ebenfalls eine p53-Mutation auf (vgl. Tabelle 12).

Pat. Nr.	Geschlecht	Alter	Anzahl Adenome	Karzinom / Lokalisation	Karzinom Größe cm	Histologische TNM Klassifikation
2A	w	82	0	1 / S	1,2	pT1, L0, V0, G2, R0
3	m	71	1	1 / A	3,8	pT2, pN1, G2
10A	w	51	3 (1)	0		Nur Adenome
13	m	76	0	1 / T	5,0	G2
18A	m	65	4	1 / S	1,4	pT1, R1, G2
29	m	56	24 (3)	1 / D	2,5	pT2, pN0, cM0, R0, G2
47A	m	66	2	1 / R	4,5	pT3, pN2, cM1, G2, L1, R2
51	m	87	2	1 / R	3,3	pT3, pN2, pM1, cR2, G2
71A	m	84	2	1 / R	5,0	pT3, pN1, G2

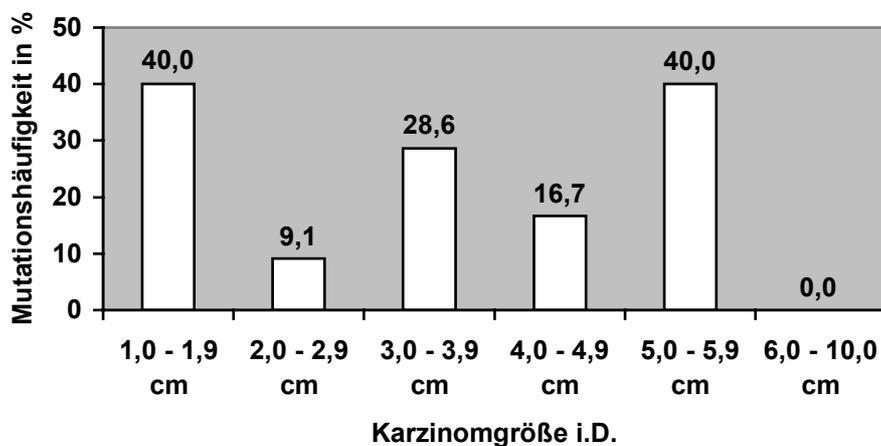
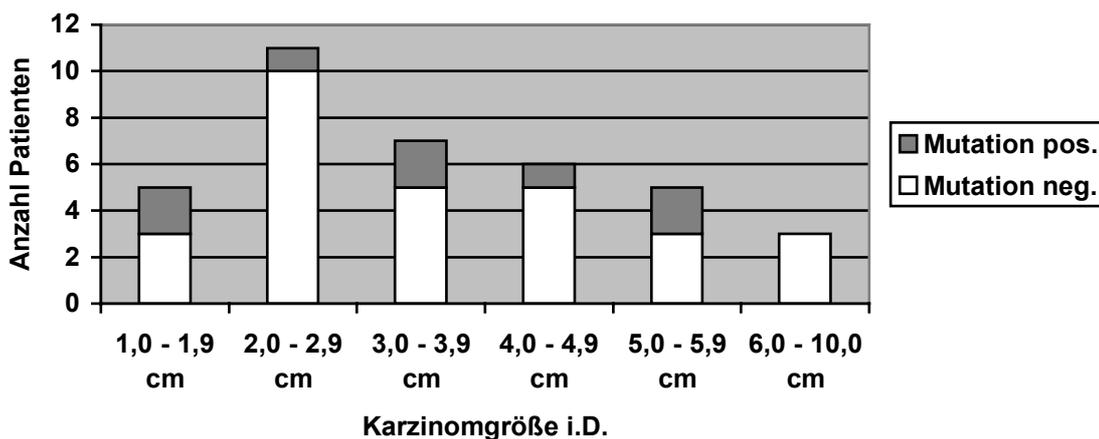
Tabelle 12: Auszug aus Tabelle 2; 9 Patienten mit Nachweis einer p53-Mutation

#### 4.4.1. Einfluss der Karzinomgröße auf das Ergebnis

Zwischen der Größe eines Karzinoms und dem Nachweis einer p53-Mutation zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang. Zur Berechnung der p-Werte wurde der exakte Fisher-Test verwendet. In Abhängigkeit von der Größe des Karzinoms i.D. ergab sich folgende Verteilung der Mutationen:

Größe i.D.	1,0-1,9 cm	2,0-2,9 cm	3,0-3,9 cm	4,0-4,9 cm	5,0-5,9 cm	6,0-10,0 cm
Mut. negativ	3	10	5	5	3	3
Mut. positiv	2	1	2	1	2	0
Summe n =	5	11	7	6	5	3
Mut. in %	40,0	9,1	28,6	16,7	40,0	0,0

Tabelle 13: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach Karzinomgröße i.D.



Abbildungen 11 : Verteilung der p53-Mutationen nach Karzinomgröße i.D., Daten aus Tabelle 13

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
Karzinom $\geq$ 2 cm i.D.	26	6	32
Karzinom $<$ 2 cm i.D.	3	2	5
Summe	29	8	37

p = 0,29166

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
Karzinom $\geq$ 3 cm i.D.	16	5	21
Karzinom $<$ 3 cm i.D.	13	3	16
Summe	29	8	37

p = 1,0

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
Karzinom $\geq$ 5 cm i.D.	6	2	8
Karzinom $<$ 5 cm i.D.	23	6	29
Summe	29	8	37

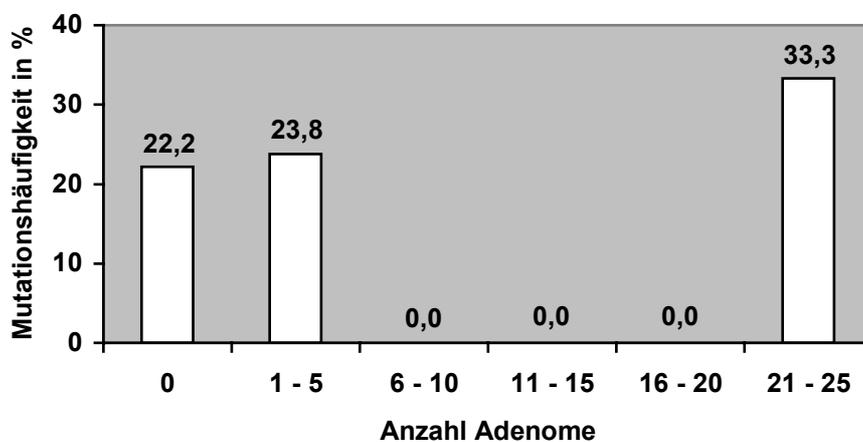
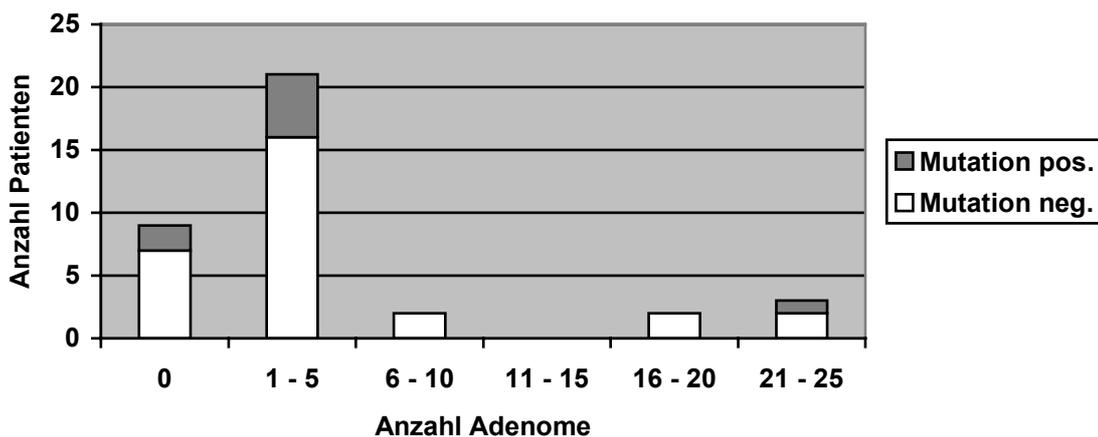
p = 1,0

#### 4.4.2. Einfluss von zusätzlich vorhandenen Adenomen auf das Ergebnis

Zwischen der Anzahl von Adenomen, die zusätzlich zu den Karzinomen vorhanden waren, und dem Nachweis einer p53-Mutation zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang. In Abhängigkeit von der Anzahl der Adenome, unabhängig von deren Größe, ergab sich folgende Verteilung der Mutationen:

Anzahl	0	1 - 5	6 - 10	11 - 15	16 - 20	21 - 25
Mut. negativ	7	16	2	0	2	2
Mut. positiv	2	5	0	0	0	1
Summe n =	9	21	2	0	2	3
Mut. in %	22,2	23,8	0,0	0,0	0,0	33,3

Tabelle 14: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach Anzahl der Adenome, unabhängig von deren Größe



Abbildungen 12: Verteilung der p53-Mutationen nach Anzahl der Adenome, unabhängig von deren Größe, Daten aus Tabelle 14

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
Karzinom und $\geq 1$ Adenom	22	6	28
Karzinom und 0 Adenome	7	2	9
Summe	29	8	37

p = 1,0

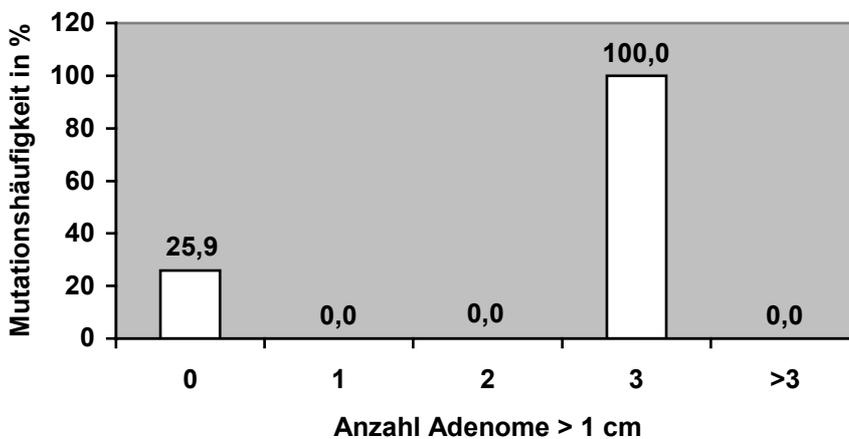
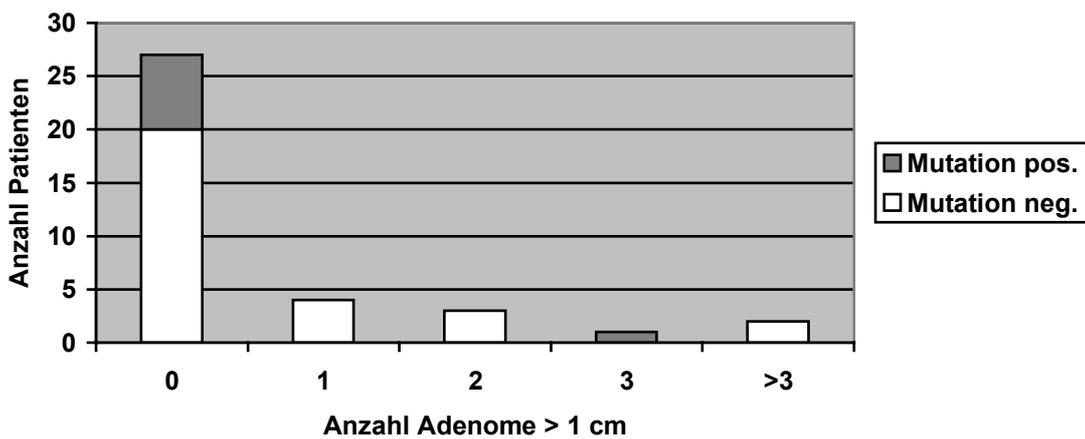
	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
Karzinom und $\geq 6$ Adenome	6	1	7
Karzinom und $< 6$ Adenome	23	7	30
Summe	29	8	37

p = 1,0

Zwischen der Größe von Adenomen, die zusätzlich zu den Karzinomen vorhanden waren, und dem Nachweis einer p53-Mutation zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang. In Abhängigkeit von der Anzahl der Adenome > 1 cm i.D. ergab sich folgende Verteilung der Mutationen:

Anzahl > 1 cm	0	1	2	3	> 3
Mut. negativ	20	4	3	0	2
Mut. positiv	7	0	0	1	0
Summe n =	27	4	3	1	2
Mut. in %	25,9	0,0	0,0	100,0	0,0

Tabelle 15: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach Anzahl der Adenome > 1 cm i.D.



Abbildungen 13: Verteilung der p53-Mutationen nach Anzahl der Adenome > 1 cm i.D., Daten aus Tabelle 15

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
Karzinom und $\geq 1$ Adenom $> 1$ cm	9	1	10
Karzinom und 0 Adenome $> 1$ cm	20	7	27
Summe	29	8	37

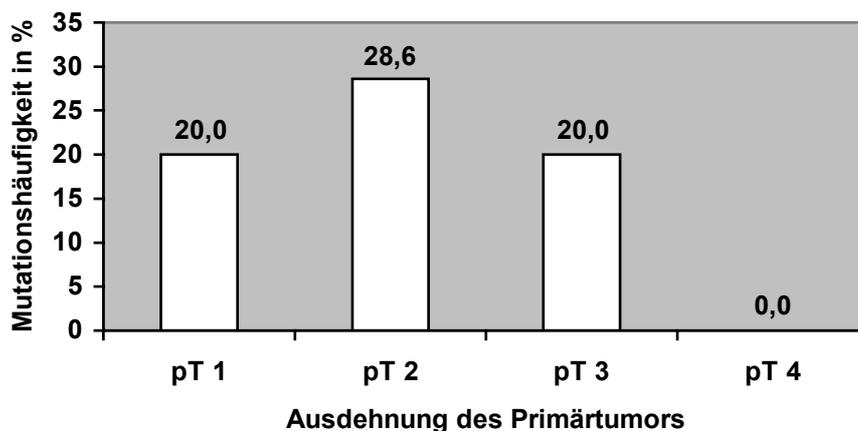
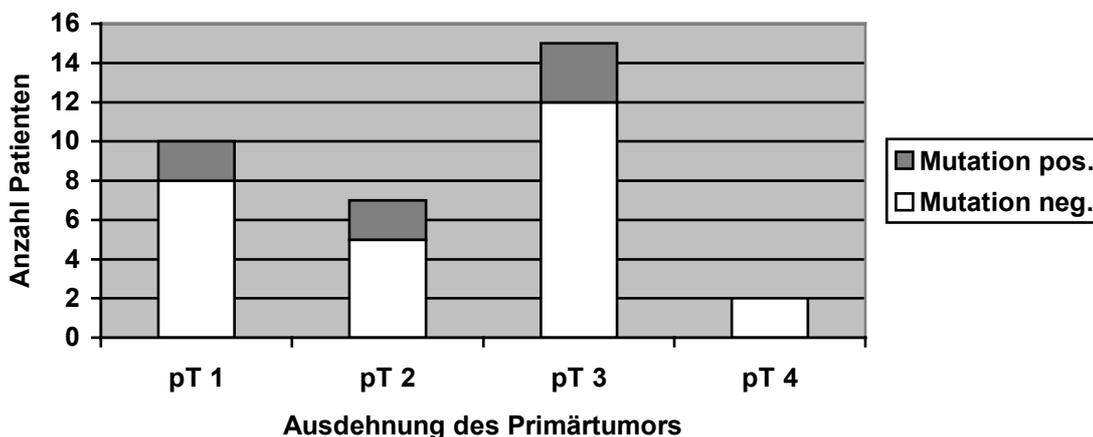
p = 0,40406

#### 4.4.3. Einfluss der TNM-Klassifikation auf das Ergebnis

Zwischen der Ausdehnung des malignen Primärtumors und dem Nachweis einer p53-Mutation zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang. In Abhängigkeit vom T-Stadium ergab sich folgende Verteilung der Mutationen:

T-Stadium	pT 1	pT 2	pT 3	pT 4
Mut. negativ	8	5	12	2
Mut. positiv	2	2	3	0
Summe n =	10	7	15	2
Mut. in %	20,0	28,6	20,0	0,0

Tabelle 16: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem T-Stadium



Abbildungen 14: Verteilung der p53-Mutationen nach dem T-Stadium, Daten aus Tabelle 16

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
pT 2 – pT 4	19	5	24
pT 1	8	2	10
Summe	27	7	34

p = 1,0

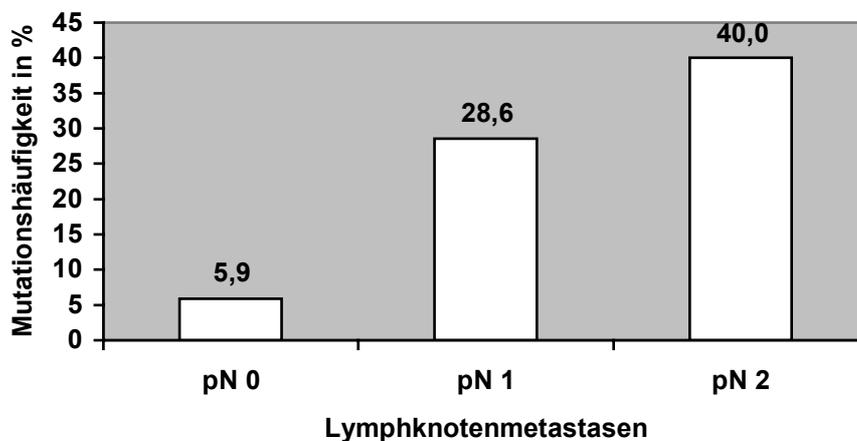
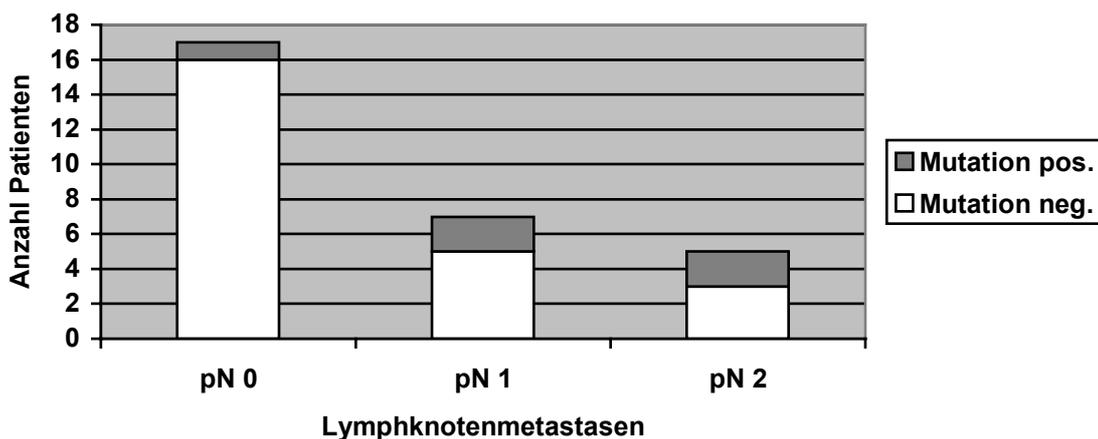
	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
pT 3 – pT 4	14	3	17
pT 1 – pT 2	13	4	17
Summe	27	7	34

p = 1,0

Zwischen dem Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und dem Nachweis einer p53-Mutation zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang. Dennoch nahm die Häufigkeit der p53 Mutationen mit dem Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung zu. In Abhängigkeit vom N-Stadium ergab sich folgende Verteilung der Mutationen:

N-Stadium	pN 0	pN 1	pN 2
Mut. negativ	16	5	3
Mut. positiv	1	2	2
Summe n =	17	7	5
Mut. in %	5,9	28,6	40,0

Tabelle 17: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem N-Stadium



Abbildungen 15: Verteilung der p53-Mutationen nach dem N-Stadium, Daten aus Tabelle 17

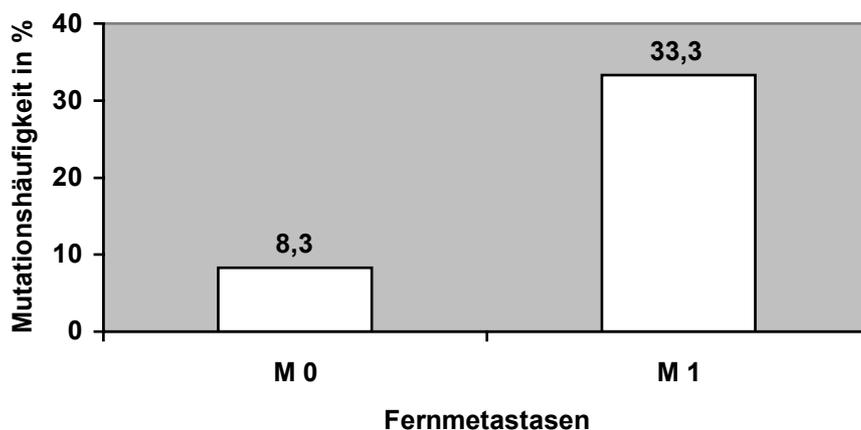
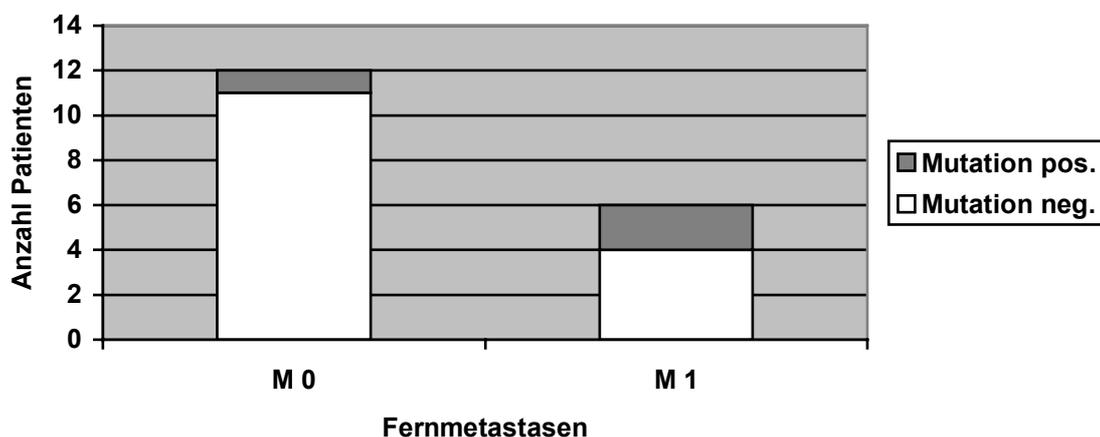
	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
pN 1 – pN 2	8	4	12
pN 0	16	1	17
Summe	24	5	29

p = 0,12964

Zwischen dem Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen und dem Nachweis einer p53-Mutation zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang. Dennoch nahm die Häufigkeit der p53 Mutationen bei Vorliegen von Fernmetastasen zu. In Abhängigkeit vom M-Stadium ergab sich folgende Verteilung der Mutationen:

M-Stadium	M 0	M 1
Mut. negativ	11	4
Mut. positiv	1	2
Summe n =	12	6
Mut. in %	8,3	33,3

Tabelle 18: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem M-Stadium



Abbildungen 16: Verteilung der p53-Mutationen nach dem M-Stadium, Daten aus Tabelle 18

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
M 1	4	2	6
M 0	11	1	12
Summe	15	3	18

p = 0,24510

Zwischen dem histopathologischen Grading und dem Nachweis einer p53-Mutation zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang. In Abhängigkeit vom G-Stadium ergab sich folgende Verteilung der Mutationen:

G-Stadium	G 1	G 2	G 3
Mut. negativ	2	25	2
Mut. positiv	0	8	0
Summe n =	2	33	2
Mut. in %	0,0	24,2	0,0

Tabelle 19: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem G-Stadium

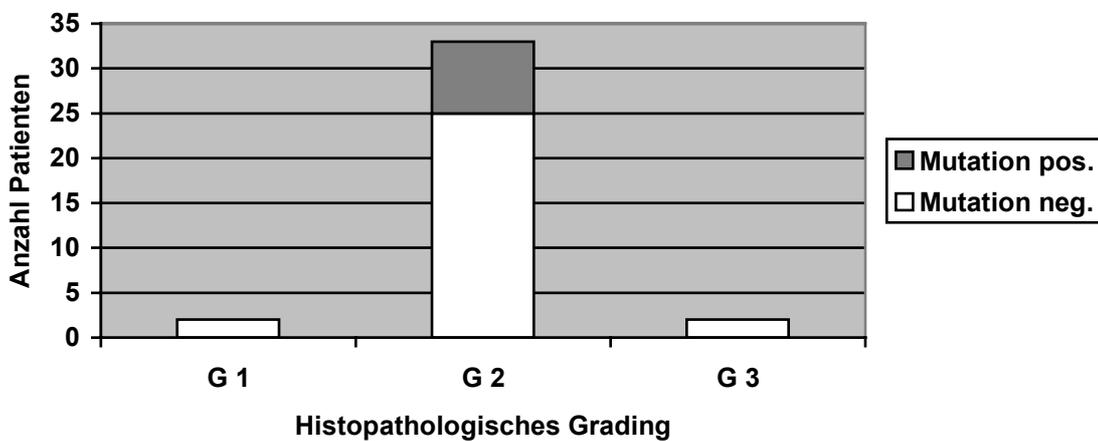


Abbildung 17: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem G-Stadium, Daten aus Tabelle 19

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
G 2 – G 3	27	8	35
G 1	2	0	2
Summe	29	8	37

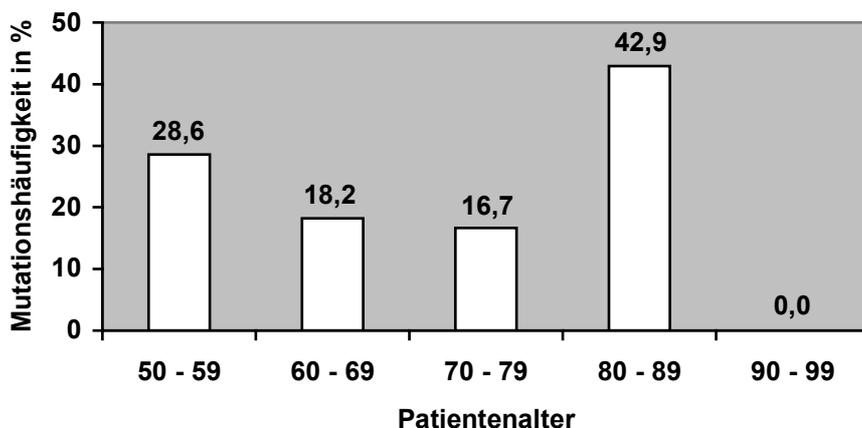
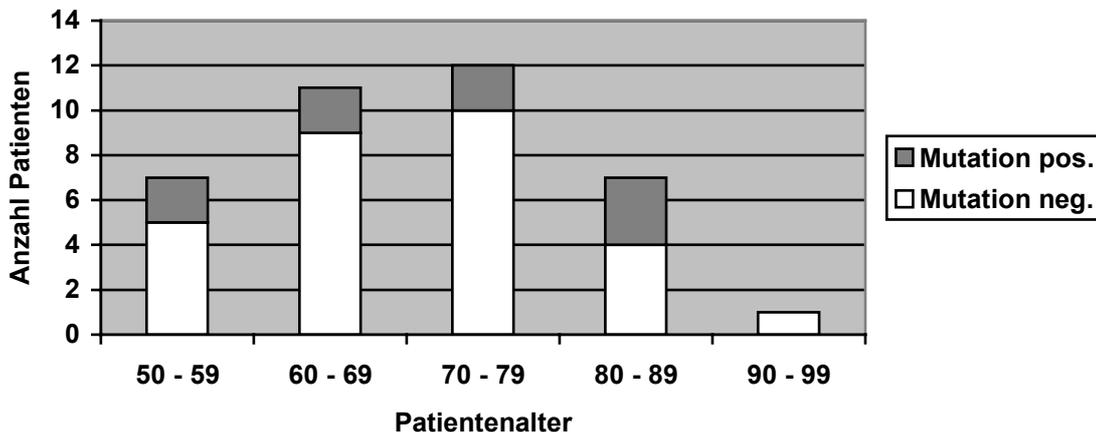
p = 1,0

#### 4.4.4. Einfluss des Patientenalters auf das Ergebnis

Zwischen dem Patientenalter und dem Nachweis einer p53-Mutation zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang. In Abhängigkeit vom Patientenalter ergab sich folgende Verteilung der Mutationen:

Alter	50 - 59	60 - 69	70 - 79	80 - 89	90 - 99
Mut. negativ	5	9	10	4	1
Mut. positiv	2	2	2	3	0
Summe n =	7	11	12	7	1
Mut. in %	28,6	18,2	16,7	42,9	0,0

Tabelle 20: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem Patientenalter



Abbildungen 18: Verteilung der p53-Mutationen nach dem Patientenalter, Daten aus Tabelle 20

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
Patientenalter $\geq$ 60	24	7	31
Patientenalter $<$ 60	5	2	7
Summe	29	9	38

p = 1,0

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
Patientenalter $\geq$ 80	5	3	8
Patientenalter $<$ 80	24	6	30
Summe	29	9	38

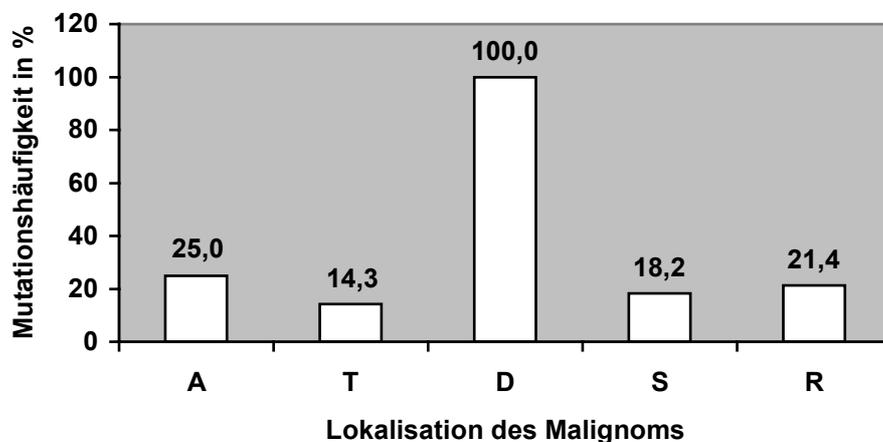
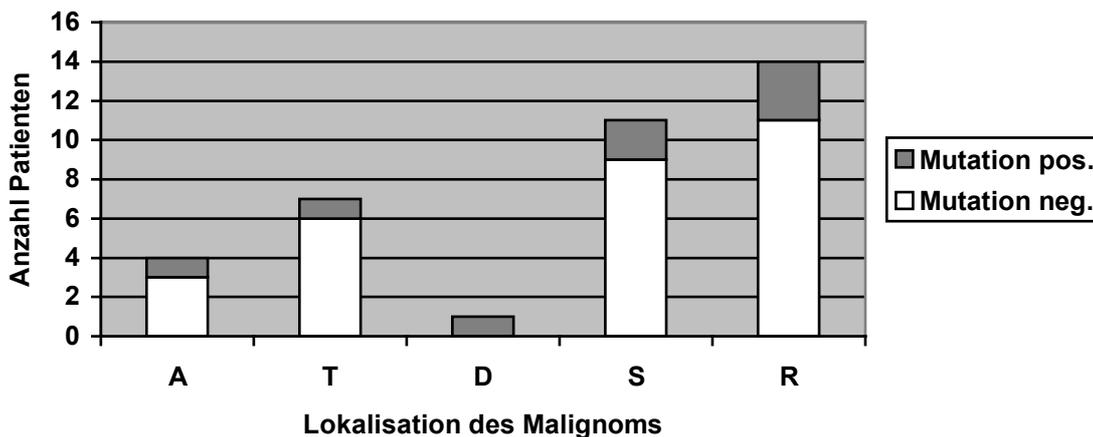
p = 0,36308

#### 4.4.5. Einfluss der Tumorlokalisation auf das Ergebnis

Zwischen der Lokalisation des Malignoms im Kolon und dem Nachweis einer p53-Mutation zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang. In Abhängigkeit von der Tumorlokalisation ergab sich folgende Verteilung der Mutationen:

Lokalisation	A	T	D	S	R
Mut. negativ	3	6	0	9	11
Mut. positiv	1	1	1	2	3
Summe n =	4	7	1	11	14
Mut. in %	25,0	14,3	100,0	18,2	21,4

Tabelle 21: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach der Tumorlokalisation; A=Colon ascendens, T=C. transversum, D=C. descendens, S=C. sigmoideum, R=Rectum



Abbildungen 19: Verteilung der p53-Mutationen nach der Tumorlokalisation, Daten aus Tabelle 21

	p53-Mutation neg.	p53-Mutation pos.	Summe
Descendens, Sigma, Rektum	20	6	26
Ascendens, Transversum	9	2	11
Summe	29	8	37

p = 1,0

## 5. Diskussion

### 5.1. Stand der Forschung

Die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms geht in der Mehrzahl der Fälle von einem Adenom aus. Hyperproliferation einer ursprünglich gesunden Kolonschleimhaut führt über gering-, mittel- und hochgradige Epitheldysplasie und Größenzunahme des Adenoms schließlich zum Wachstum eines invasiven Karzinoms. An dieser sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein sind verschiedene Genmutationen maßgeblich beteiligt. Besonders die Tumorsuppressorgene APC, DCC und p53, sowie das Onkogen k-ras spielen hier eine Rolle<sup>30,99</sup>. Durch Mutationen auf diesen Genen kommt es zu einem gestörten Zellwachstum, zu verminderter Apoptose oder fehlerhaften Reparaturmechanismen. Die betroffenen Zellen erhalten einen Wachstumsvorteil gegenüber dem gesunden Gewebe.

Das p53-Tumorsuppressorgen nimmt eine Schlüsselstellung in der Adenom-Karzinom-Sequenz ein, da es von allen Genmutationen am häufigsten betroffen ist<sup>98</sup>. Das Protein des p53-Gens ist an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt. Bei Auftreten eines DNA Schadens in der Zelle kann das intakte p53-Protein die Progression des Zellzyklus stoppen um eine DNA Reparatur zu ermöglichen oder die Apoptose der Zelle einleiten, wenn eine Reparatur nicht möglich ist<sup>87</sup>. In Zellen, in denen eine p53-Mutation vorliegt sind diese Kontrollmechanismen nicht mehr funktionstüchtig und ebnet den Weg für abnormes und invasives Wachstum. Mutationen des p53-Gens treten erst spät im Laufe der Adenom-Karzinom-Sequenz auf und werden für den letzten Schritt zur Entstehung eines invasiven Karzinoms verantwortlich gemacht. In etwa 70 % aller kolorektalen Karzinome können p53-Mutationen nachgewiesen werden<sup>94,99</sup>. In Adenomen sind p53-Mutationen hingegen selten nachzuweisen. Allerdings nimmt die Häufigkeit von p53-Mutationen in Adenomen mit dem Dysplasiegrad und der Adenomgröße zu<sup>78</sup>.

Da es keine zuverlässigen Frühsymptome für die Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom gibt, wird die Erkrankung oft erst in einem späten Stadium erkannt. Eine Heilung verspricht aber nur die chirurgische Intervention im Frühstadium, die Prognose in fortgeschrittenen Krankheitsstadien ist meist schlecht<sup>18</sup>. Für einen kurativen therapeutischen Ansatz sind also Methoden zur Früherkennung erforderlich. Die bisher gebräuchlichen Untersuchungsmethoden, der Test auf okkultes Blut im Stuhl sowie die komplette Koloskopie, sind beide mit Nachteilen behaftet. Die geringe Sensitivität und Spezifität des Hämokult®-Tests und die aufwendige und invasive Koloskopie mit dem

Risiko einer Blutung, Perforation oder Infektion machen also eine Verbesserung der Screening-Methoden notwendig.

Die genetischen Veränderungen während der Tumorgenese kolorektaler Tumoren bieten einen attraktiven Ansatz für die Früherkennung dieser ersten Erkrankung. Da die Zellen kolorektaler Tumoren wegen des erhöhten Zellumsatzes verstärkt in das Darmlumen abgestoßen und zusammen mit dem Stuhl ausgeschieden werden<sup>12</sup>, ist ein Nachweis spezifischer Genmutationen im Stuhl möglich. Man kann sogar feststellen, dass die Quantität und Qualität der aus Stuhlproben extrahierten DNA bei Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms erhöht ist<sup>97</sup>, da die DNA aus Tumorzellen in Gegensatz zur DNA aus apoptotischen Zellen nicht automatisch abgebaut wird. Früher abgeschlossene Arbeiten untersuchten, ob die gleichen Mutationen, die im Gewebe kolorektaler Tumoren nachgewiesen werden auch in der entsprechenden Stuhlprobe nachweisbar sind. Dong et al. fand in 30 von 51 (59 %) kolorektalen Karzinomen Mutationen des p53-Gens, in allen 30 Fällen ließen sich diese spezifischen Mutationen auch in der Stuhlprobe des Patienten nachweisen<sup>24</sup>. Auf diese Weise könnte die molekularbiologische Detektion von Mutationen auf Onkogenen und Tumorsuppressorgenen im Stuhl eine einfache Diagnose ermöglichen<sup>93</sup>. Die theoretischen Vorteile lägen in einer nicht invasiven, risikolosen Untersuchung mit hoher Spezifität. Ein weiterer Ansatz besteht im Nachweis solcher Mutationen im Serum von Patienten. Borchers et al. konnte beispielsweise bei 5 von 16 (31 %) Patienten mit einem kolorektalen Karzinom k-ras Mutationen im Serum nachweisen<sup>13</sup>. Allerdings bleiben noch einige Probleme zu lösen. Besonders die Extraktion der DNA aus dem Stuhl bereitet große Schwierigkeiten, weil die menschliche DNA oft degradiert vorliegt und Verdauungsprodukte sowie bakterielle Verunreinigungen die PCR inhibieren<sup>6</sup>.

Mit der Untersuchung von Kolonlavageproben wurde in vorliegender Arbeit versucht diese Probleme zu umgehen. Einige andere Arbeiten zeigten bereits, dass die Extraktion von DNA aus Kolonlavageflüssigkeit sicherer und weniger problematisch ist<sup>43,52,53,92</sup>. Kolonlavageflüssigkeit entsteht bei der Darmreinigung vor einer Koloskopie und enthält sowohl die Polyethylen-Glykol- und elektrolythaltige Trinklösung als auch Zellen des Darmlumens. Dabei sind Kolonepithelzellen eher selten zu finden<sup>39</sup>. Bei Vorliegen einer malignen Erkrankung lassen sich allerdings neoplastische Zellen nachweisen<sup>15,35,77</sup>. Als Folge der Darmreinigung ist die Kolonlavageflüssigkeit weitgehend frei von PCR-inhibierenden Einflüssen. Das konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Sowohl die Extraktion der DNA als auch die PCR waren in allen Fällen problemlos durchführbar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war erstens, eine Methode zu optimieren, die den Nachweis von p53-Genmutationen in Kolonlavageproben auf einer einfachen und breiten Basis erlaubt. Ausgangspunkt hierfür war die SSCP-Analyse. Zweitens sollte die Sensitivität dieser etablierten Methode ermittelt werden. Drittens sollte die Methode in einem Kollektiv von 38 Patienten getestet und das Ergebnis auf eine Korrelation zwischen dem Mutationsnachweis und bestimmten Patientencharakteristika untersucht werden.

Mit dieser etablierten Methode zum Nachweis von p53-Mutationen könnte, bei konsequenter Untersuchung der Lavageflüssigkeit, die bei Koloskopien anfällt, die Rate von 15 % falsch negativer Koloskopiebefunde gesenkt werden <sup>11,16,72</sup>. Außerdem könnte sich die Tumornachsorge durch engmaschige Kontrolle dieser Genmarker verbessern lassen. Theoretisch könnten damit sogar Malignome des Magens, des Pankreas oder der Gallenwege nachgewiesen werden, da sich Zellen des gesamten Gastrointestinaltraktes auch in der Kolonlavage wiederfinden könnten. Weiterhin könnte diese Methode auch bei der Entwicklung eines klinisch durchführbaren Stuhl-Screenings zur Früherkennung kolorektaler Tumoren verwendet werden.

Einige andere Arbeiten haben sich bereits mit der Detektion von Genmutationen in Kolonlavageproben beschäftigt. Der erste Nachweis wurde 1994 in einer Studie mit 39 Risikopatienten dokumentiert <sup>92</sup>. Weitere Genmutationen in Kolonlavageproben wurden 1997 in einer Studie von 14 Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung beschrieben <sup>52</sup> und etwas später in einer ausgedehnteren Studie mit 31 Patienten bestätigt <sup>53</sup>. Eine neuere Arbeit von Heinzlmann und Lang et al. untersuchte die Lavageflüssigkeit von 73 Patienten mit Colitis ulcerosa und 58 Patienten mit Morbus Crohn auf Mutationen des k-ras-Gens und des p53-Gens <sup>42</sup>. K-ras Mutationen auf Codons 12 und 13 wurden mittels Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden und p53 Mutationen der Exons 5-8 mittels SSCP-Analyse detektiert. 19 % der Patienten mit ausgedehnter Colitis ulcerosa (8 von 43, davon 5 p53- und 3 k-ras-Mutationen) und 15 % der Morbus Crohn Patienten mit Kolonbefall (8 von 52, davon 3 p53- und 5 k-ras-Mutationen) hatten nachweisbare Genmutationen in der Kolonlavage. In 2 (1 %) von 190 Fällen konnte keine geeignete DNA aus den Lavageproben extrahiert werden.

Potter et al. untersuchte die Lavageflüssigkeit von 40 Karzinompatienten auf Mutationen des k-ras-Gens (Codon 12), des p53-Gens (Codon 248), des TGF- $\beta$  RII-Gens (Exon 3) und des APC-Gens (mutation cluster region) <sup>70</sup>. Zusätzlich wurde jeweils auch das Gewebe des kolorektalen Karzinoms auf diese Regionen untersucht. Punktmutationen auf Codon 248 des p53-Gens wurden mittels PCR-Anreicherung detektiert. Die Analyse des Tumorgewebes zeigte bei 45 % (18 von 40, davon 2 p53-Mutationen) der Patienten

Mutationen. Der Nachweis von Mutationen in der Kolonlavage gelang aber nur bei 10 % (4 von 40, davon 2 p53-Mutationen) der Patienten. Alle in den Tumoren nachgewiesenen p53-Mutationen konnten also auch in der entsprechenden Lavageprobe bestätigt werden. In 3 (8 %) Fällen konnte keine geeignete DNA aus den Lavageproben extrahiert werden.

In einer weiteren Arbeit von Heinzlmann et al. wurden Lavagelösungen von 45 Patienten mit kolorektalen Adenomen und von 20 Patienten mit kolorektalen Karzinomen auf Mutationen des k-ras-Gens und des p53-Gens untersucht <sup>43</sup>. K-ras Mutationen auf Codons 12 und 13 wurden mittels Dot-blot-Hybridisierung und p53 Mutationen der Exons 5-8 mittels SSCP-Analyse detektiert. 16 % der Patienten mit kolorektalen Adenomen (7 von 45, davon 3 p53- und 4 k-ras-Mutationen) und 25 % der Patienten mit kolorektalen Karzinomen (5 von 20, davon 4 p53- und 1 k-ras-Mutation) zeigten Genmutationen in den Kolonlavageproben. Bei alleiniger Betrachtung des p53-Gens konnten bei 7 % der Adenompatienten und bei 20 % der Karzinompatienten Mutationen nachgewiesen werden. Die DNA-Extraktion aus der Lavageflüssigkeit gelang in allen Fällen.

## **5.2. Methodik- und Ergebnisdiskussion**

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der sorgfältigen Etablierung der Methodik. Für die Etablierung wurden PCR-Produkte von Zelllinien mit bekannten p53 Mutationen in entsprechenden Codons verwendet (positiv Kontrolle) und mit PCR-Produkten von Wildtyp-DNA aus Leukozyten (negativ Kontrolle) verglichen. Alle 8 Mutationen dieser Zelllinien ließen sich mit dieser Methode zweifelsfrei nachweisen. Auf diese Weise war gewährleistet, dass häufig auftretende Mutationen des p53 Gens, insbesondere Hot-spot Codons, in der SSCP-Analyse erkannt werden. Zusätzlich konnte dadurch bei Detektion einer Mutation in der Kolonlavageprobe das betroffene Codon identifizieren werden. Durch Vergleich der Bandenverschiebung in der Lavageprobe des Patienten mit den Bandenverschiebungen der Zelllinien war in 78 % (7 von 9) das betroffene Codon erkennbar. Dieser Prozentsatz ließe sich bei Verwendung einer größeren Anzahl von Zelllinien noch steigern. Soweit bekannt, wurden in keiner der oben genannten Arbeiten diese Zelllinien in ähnlicher Weise für die Etablierung und positiv Kontrolle, insbesondere der Hot-spot Codons, verwendet.

Bei den 37 hier untersuchten Karzinompatienten konnten 8 (22 %) p53 Mutationen in den Kolonlavageproben nachgewiesen werden. Der Anteil der gefundenen Mutationen dieser Arbeit ist zwar geringfügig höher als in der oben beschriebenen Arbeit von Heinzlmann et al. (22 % im Vergleich zu 20 %), trotzdem liegt dieser Prozentsatz deutlich unter den

Erwartungen. Da man weiß, dass etwa 70 % aller kolorektalen Karzinome p53 Mutationen aufweisen<sup>94,99</sup>, scheint die Anzahl detektierter Mutationen hier zu gering zu sein. Denkbare Ursachen sind erstens eine abweichende Verteilung in einem kleinen Patientenkollektiv. Der Anteil von p53 Mutationen im Tumorgewebe der Patienten ist nicht bekannt. Zweitens beschränkte sich diese Arbeit auf die Untersuchung der Exons 5-8. Zwar wurde gezeigt, dass p53 Mutationen hauptsächlich Exons 5-8 betreffen<sup>9,20,64</sup>, eine neuere Publikation von Soussi et al. geht aber davon aus, dass ca. 14 % aller p53 Mutationen außerhalb Exons 5-8 liegen<sup>85</sup>. Wahrscheinlicher ist allerdings eine zu geringe Sensitivität der Methode. Durch Austestung mehrerer Verdünnungsreihen mutierter DNA (aus Zelllinien) in Wildtyp-DNA (aus Leukozyten) konnte gezeigt werden, dass ein Anteil von  $\geq 20$  % mutierter DNA in der Wildtyp-DNA nötig ist, um die Mutation in der SSCP-Analyse nachzuweisen. Da aber in Lavageproben neben der menschlichen DNA auch Bakterien-DNA sowie zusätzlich ein Verdünnungseffekt durch die Polyethylen-Glykol-Lösung auftritt, kann der Anteil mutierter DNA unterhalb der Sensitivitätsgrenze der SSCP-Analyse liegen. Beispielsweise wird der Anteil menschlicher DNA an der Gesamt-DNA, die aus Stuhlproben extrahiert werden kann, auf 10 % geschätzt<sup>41</sup>. Und nur 1-24 % hiervon ist Tumor DNA<sup>4</sup>.

Um die Ergebnisse der SSCP-Analyse zu bestätigen, wurden die Proben von 10 Patienten sequenziert. In 5 Fällen (50 %) konnte das SSCP-Ergebnis bestätigt werden. Die anderen 5 Fälle wiesen zwar in der SSCP-Analyse eine Mutation auf, in der Sequenzierung konnten diese Mutationen aber nicht nachgewiesen werden. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Erstens wurden bei der Amplifikation der DNA-Abschnitte für die Sequenzierung zwei PCR-Reaktionen benötigt. Nur durch diese Re-PCR konnte ein ausreichendes DNA-Produkt gewonnen werden. Folglich war die Qualität der PCR-Produkte vermindert. Zweitens hat auch die Sequenzanalyse nur eine begrenzte Sensitivität. Tessitore et al. untersuchte Sensitivität und Spezifität von SSCP-Analyse und Sequenz-Analyse<sup>91</sup>. Die Analyse der Exons 5-9 des p53-Gens bei 41 Brustkrebs Patienten zeigte sogar eine geringere Sensitivität der Sequenzanalyse. Durch die SSCP-Analyse konnten Mutationen in 19 (46 %) Gewebeproben nachgewiesen werden, die Sequenzanalyse zeigte die Mutationen aber nur in 13 (32 %) Proben. In einer Arbeit von Ueno et al. wiesen SSCP und Sequenz-Analyse zumindest gleichwertige Sensitivitäten auf<sup>95</sup>.

Um einen Zusammenhang zwischen der Bandenstärke in der SSCP-Analyse und dem Nachweis einer Mutation in der Sequenzierung zu prüfen, wurde die Ausprägung der mutierten Banden in zwei Kategorien eingeteilt. Starke Bandenausprägung stand dabei für

einen vergleichsweise hohen Anteil an mutierter DNA, schwach ausgeprägte Banden für einen geringen Anteil mutierter DNA. Von 6 starken Banden waren 3 (50 %), von 3 schwachen Banden war eine (33 %) in der Sequenzanalyse positiv. So ließ sich hier zwar eine Tendenz erkennen, ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte allerdings nicht gezeigt werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Größe des Karzinoms, zusätzlich vorhandene Adenome, die histopathologische TNM-Klassifikation, das Patientenalter oder die Tumorlokalisation einen Einfluss auf die Detektion der p53 Mutationen hatte. Keiner dieser Parameter zeigte einen statistisch signifikanten Einfluss auf den Mutationsnachweis. Bezüglich der Karzinomgröße ließ sich kein Trend erkennen. Mutationen konnten bei Karzinomen fast aller Größen nachgewiesen werden. Beispielsweise zeigten 1,0-1,9 cm große Tumoren den gleichen Anteil Mutationen (40 %) wie 5,0-5,9 cm große Tumoren. Zusätzlich zu den Karzinomen vorhandene Adenome hatten weder bezüglich ihrer Anzahl noch ihrer Größe Einfluss auf den Mutationsnachweis. Obwohl Adenome bei multiplem Auftreten oder ab einer Größe von 1 cm als wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms gelten <sup>7,96</sup>, war hier eine fehlende Korrelation zu erwarten, da p53 Mutationen erst spät im Laufe der Adenom-Karzinom-Sequenz auftreten <sup>99</sup>. Patienten ohne zusätzliche Adenome wiesen etwa den gleichen Anteil Mutationen auf wie Patienten mit zusätzlichen kolorektalen Adenomen (22 % im Vergleich zu 21 %, p=1,0). Die Ausdehnung des malignen Primärtumors zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf den Mutationsnachweis. Patienten im Stadium pT 1 wiesen etwa den gleichen Anteil Mutationen auf wie Patienten in den Stadien pT 2 – pT 4 (20 % im Vergleich zu 21 %, p=1,0). Allerdings lies sich sowohl bei Auftreten von Lymphknotenmetastasen als auch bei Fernmetastasen eine deutliche Tendenz erkennen. Mit den Stadien pN 0, pN 1 und pN 2 stieg der Anteil der p53 Mutationen von 6 % auf 29 % und 40 %. Patienten mit Lymphknotenmetastasen waren also häufiger betroffen als Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (33 % im Vergleich zu 6 %, p=0,12964). Ähnliches galt bei Vorliegen von Fernmetastasen. Patienten mit Fernmetastasen wiesen häufiger p53 Mutationen auf als Patienten ohne Fernmetastasen (33 % im Vergleich zu 8 %, p=0,24510). Über den Einfluss des Gradings, das einen Maßstab für die Malignität eines kolorektalen Karzinoms bietet, lässt sich keine Aussage treffen. 33 von 37 (89 %) der Karzinome waren mäßig differenziert (G2) und alle Mutationen traten in diesem Stadium auf. Ein Vergleich mit den Stadien G1 und G3 ist aufgrund der geringen Fallzahl nicht sinnvoll. Auch bezüglich des Patientenalters zeigte sich keine Signifikanz. P53 Mutationen traten in fast allen Altersklassen auf. Dabei schienen Patienten  $\geq 80$  Jahre geringfügig

häufiger betroffen zu sein als Patienten < 80 Jahre (38 % im Vergleich zu 20 %,  $p=0,36308$ ). Auch die Verteilung der Mutationen nach der Lokalisation des Karzinoms ließ keinen Schwerpunkt erkennen. Mutationen konnten aus allen Abschnitten des Kolons nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen keine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und dem Nachweis von p53 Mutationen. Eine Zunahme der p53 Mutationen mit der Karzinomgröße, der Ausdehnung des Tumors oder dem Grading wäre jedoch zu erwarten gewesen. Die Ursache für diese fehlende Korrelation kann in der geringen Fallzahl liegen.

Einer der hier untersuchten Patienten hatte einen 3 cm großen, tubulo-villösen Polyp im Colon ascendens, sowie zwei adenomatöse Minipolypen. Malignität konnte nicht nachgewiesen werden. Auch bei diesem Patienten zeigte sich eine p53-Mutation. In der Arbeit von Heinzlmann et al. wurden ebenfalls, wenn auch seltener, p53 Mutationen bei kolorektalen Adenomen detektiert<sup>43</sup>. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Nachweis von p53 Mutationen auch schon in prämaligen Stadien möglich ist. Dennoch treten Mutationen des p53-Gens erst spät im Laufe der Adenom-Karzinom-Sequenz auf<sup>99</sup> und ein Screening weiterer Gene erscheint sinnvoll. Die Detektion von Mutationen auf dem APC-, k-ras- oder DCC-Gen sowie Mikrosatelliteninstabilität kann eine Tumordiagnose in früheren Stadien ermöglichen. Zusätzlich kann durch Einschluss mehrerer Gene die Sensitivität für den Nachweis von Tumoren erhöht werden. Dong et al. untersuchte Stuhlproben und Tumorgewebe von 51 Patienten mit kolorektalem Karzinom auf drei Genmarker<sup>24</sup>. In den Stuhlproben konnten in 30 (59 %) Fällen p53 Mutationen, in 3 (6 %) Fällen Bat-26 Deletionen und in 8 (16 %) Fällen k-ras Mutationen nachgewiesen werden. Alle drei Marker zusammen detektierten Mutationen im Stuhl von 36 Patienten (71 %). Ahlquist et al. untersuchte Stuhlproben von 22 Patienten mit kolorektalem Karzinom und von 11 Patienten mit kolorektalen Adenomen  $\geq 1$  cm auf fünf genetische Marker<sup>4</sup>. Bei den Karzinompatienten traten 4 (18 %) k-ras Mutationen, 5 (23 %) APC Mutationen, 3 (14 %) p53 Mutationen, 5 (23 %) Bat-26 Deletionen und in 14 (64 %) Fällen long-DNA, als Marker für nicht apoptotische Tumorzellen, auf. Alle Marker zusammen konnten Alterationen im Stuhl von 20 (91 %) der Karzinompatienten detektieren. Bei den Adenompatienten traten 1 (9 %) k-ras Mutation, 3 (27 %) APC Mutationen, keine (0 %) p53 Mutationen, keine (0 %) Bat-26 Deletionen und in 6 (55 %) Fällen long-DNA auf. Alle Marker zusammen konnten hier Alterationen im Stuhl von 9 (82 %) der Adenompatienten nachweisen.

Dennoch kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein Screening des Stuhls auf Genmutationen die fäkale okkulte Bluttestung bzw. die Koloskopie nicht ersetzen. Zunächst müssen Sensitivität und Spezifität in großen klinischen Studien mit repräsentativen Populationen ermittelt werden um zu sehen, ob die Vorteile des Stuhlscreenings gegenüber den herkömmlichen Methoden überwiegen. Es muss geprüft werden welche der genetischen Marker sich für ein Screening eignen. Außerdem müssen die derzeit aufwendigen und kostenintensiven Methoden praktikabler gestaltet werden damit sie eine breite Anwendung finden.

Ein großer Vorteil der Untersuchung von Kolonlavageflüssigkeit ist die, im Gegensatz zu Stuhluntersuchungen, problemlose Extraktion und Amplifikation der DNA. Mit der hier optimierten Methode der SSCP-Analyse konnte gezeigt werden, dass ein Nachweis von p53 Mutationen in Lavageproben von Kolonkarzinompatienten leicht möglich ist, und dass dieser Nachweis sogar bei kleinen, auf Mukosa und Submukosa beschränkten, Karzinomen gelingt. Weiterhin konnten Mutationen aus allen Abschnitten des Kolons nachgewiesen werden. Die Lavageflüssigkeit repräsentiert offensichtlich das gesamte Kolon besser als willkürlich entnommene Probiopsien und es bleibt zu prüfen, ob sich hier auch genomische DNA von Malignomen aus anderen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes nachweisen lässt. Ein solches Screening der Kolonlavage auf Genmutationen könnte zukünftig auch den Nachweis eines Magen-, Pankreas- oder Gallenblasenkarzinoms ermöglichen.

Zwar wurden mit dieser Methode auch prä maligne Tumorstadien detektiert, dennoch sollten für die Früherkennung kolorektaler Tumoren weitere Genmarker in das Screening miteingebunden werden. Nachfolgende Studien an einem größeren Patientenkollektiv können klären, ob sich so die Rate falsch negativer Koloskopiebefunde senken lässt oder ob sich die Tumornachsorge durch engmaschige Kontrolle dieser Genmarker verbessern lässt. Obwohl es sich um einen vielversprechenden Ansatz handelt, darf man nicht vergessen, dass für die Untersuchung von Kolonlavageproben dennoch eine invasive Koloskopie, mit all ihren Vor- und Nachteilen, notwendig ist. Das Screening von Kolonlavageflüssigkeit kann also die Koloskopie nicht ersetzen, ein Stuhlscreening erscheint deshalb zukunftsweisend.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt eignet sich die hier vorgestellte Methode nicht für eine Routinediagnostik. In weiteren Arbeiten sollte zunächst versucht werden die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Erfolgsversprechend sind mutationspezifische Anreicherungsverfahren, welche die Amplifikation des Wildtyps unterdrücken, wie PNA (peptide nucleic acid) - vermittelte PCR oder eine sequenzspezifische Anreicherung der

verwendeten DNA mit Streptavidin-markierten magnetischen Beads. Auf diese Weise kann künftig die hier etablierte SSCP-Analyse auch als Basis für ein Stuhlscreeing genutzt werden und die Früherkennung kolorektaler Tumoren auf molekularer Basis ermöglichen.

## 6. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist die zweithäufigste Todesursache durch maligne Tumoren in den Industrienationen, verantwortlich für mehr als 10 % aller Krebstoten, mit zunehmender Inzidenz. Eine Heilung verspricht nur die chirurgische Intervention im Frühstadium, die Prognose in fortgeschrittenen Krankheitsstadien ist meist schlecht. Die Entdeckung der genetischen Veränderungen während der Tumorgenese kolorektaler Tumoren lässt hoffen, dass eine Früherkennung dieser ersten Erkrankung über den Nachweis bestimmter Genmutationen im Stuhl oder der Kolonlavageflüssigkeit möglich ist. Die dabei am häufigsten auftretenden Mutationen betreffen das p53-Tumorsuppressorgen.

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung einer Methode zum Nachweis von p53 Mutationen in Kolonlavageproben. Mit Hilfe einer „Single Strand Conformation Polymorphism“ – Analyse war ein einfaches Screening der Exons 5-8 des p53-Gens möglich. Für die Etablierung dieser SSCP-Analyse und als positiv Kontrolle dienten die Zelllinien SW480, HaCat, Kle-1B, Hec-1B, Hut 78 und BT-20. Alle Mutationen der Zelllinien ließen sich in der optimierten SSCP-Analyse zweifelsfrei nachweisen. Dabei konnte bezüglich der Sensitivität dieser Methode gezeigt werden, dass ein Anteil von  $\geq 20$  % mutierter DNA in der Wildtyp-DNA nötig ist, um die Mutation nachzuweisen.

Bei 37 Patienten mit kolorektalem Karzinom und einem Patienten mit einem 3 cm großen kolorektalen Adenom wurde eine Koloskopie durchgeführt. Die Tumoren wurden histopathologisch klassifiziert und die Lavageflüssigkeit zur weiteren Analyse gesammelt. Nach der Extraktion der DNA aus den Lavageproben folgten PCR und Reinigung der Amplifikate. Sowohl die Extraktion der DNA als auch die Amplifikation konnte in allen Fällen problemlos durchgeführt werden. P53 Mutationen konnten mit Hilfe der SSCP-Analyse bei 8 (22 %) der Karzinompatienten und bei dem Adenompatienten (100 %) detektiert werden. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und dem Mutationsnachweis. Weiter zeigte sich keine Korrelation zwischen zusätzlich zu den Karzinomen vorhandenen Adenomen und dem Mutationsnachweis.

Mit der hier verwendeten Methode ist ein Nachweis von p53 Mutationen in Kolonlavageproben möglich. Es konnten Mutationen sowohl in einem prämaligen Stadium als auch bei kleinen, auf Mukosa und Submukosa beschränkten, Karzinomen nachgewiesen werden. Der Mutationsnachweis gelang bei Tumoren aus allen Kolonabschnitten. Dennoch ist die Sensitivität der hier vorgestellten Methode zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausreichend. Weitere Studien werden benötigt, um die Sensitivität beispielsweise durch DNA-Anreicherungsverfahren zu erhöhen.

## 7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms; T=Ausdehnung des Primärtumors, N=Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung, M=Fehlende oder vorhandene Fernmetastasen, X=jedes Stadium.....	7
Tabelle 2: Patientenkollektiv; Anzahl der Adenome > 1 cm i.D. in Klammern; A=Colon ascendens, T=C. transversum, D=C. descendens, S=C. sigmoideum, R=Rectum; Karzinomgröße=mittlerer Durchmesser in cm; Entsprechend der TNM-Klassifikation: T=Ausdehnung des Primärtumors, N=Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung, M=Fehlende oder vorhandene Fernmetastasen, X=Kann nicht beurteilt werden, G=Histopathologisches Grading, V=Einbruch in die Venen, L=Einbruch in das Lymphsystem, R=Resektionsgrenzen, p=Postoperativ, c=Befundsicherung.....	18
Tabelle 3: Primer p53 – Exons 5-8.....	20
Tabelle 4: Übersicht Exons 5-8 / Zelllinien; * absolute Häufigkeit des mutierten Codons aus insgesamt 1635 nachgewiesenen Mutationen des p53-Gens bei kolorektalen Tumoren <sup>86</sup> .....	21
Tabelle 5: PCR Protokoll.....	21
Tabelle 6: Optimierte Bedingungen für die SSCP-Analyse der Exons 5.1. bis 8.....	24
Tabelle 7: SSCP Elektrophoresebedingungen.....	25
Tabelle 8: Primer p53 - Sequenzierung.....	26
Tabelle 9: Sequenzierung der DNA von 10 Patienten.....	26
Tabelle 10: Protokoll der Re-PCR für die Sequenzierung.....	27
Tabelle 11: Ergebnisse der SSCP-Analyse.....	29
Tabelle 12: Auszug aus Tabelle 2; 9 Patienten mit Nachweis einer p53-Mutation.....	32
Tabelle 13: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach Karzinomgröße i.D. ....	33
Tabelle 14: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach Anzahl der Adenome, unabhängig von deren Größe.....	35
Tabelle 15: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach Anzahl der Adenome > 1 cm i.D. ....	37
Tabelle 16: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem T-Stadium.....	39
Tabelle 17: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem N-Stadium.....	41

Tabelle 18: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem M-Stadium .....	43
Tabelle 19: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem G-Stadium .....	45
Tabelle 20: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem Patientenalter .....	46
Tabelle 21: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach der Tumorlokalisation; A=Colon ascendens, T=C. transversum, D=C. descendens, S=C. sigmoideum, R=Rectum .....	48

Abbildung 1: Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein <sup>30</sup> ; Frühes Adenom $\leq 1,0$ cm, Intermediäres Adenom $> 1,0$ cm ohne Karzinomanteile, Spätes Adenom $> 1,0$ cm mit Karzinomanteilen .....	9
Abbildung 2: Mutationshäufigkeit verschiedener Codons aus insgesamt 1635 Mutationen des p53-Gens bei kolorektalen Adenomen und Karzinomen <sup>86</sup> , besonders häufig auftretende Mutationen in den Hot-spot Codons 175, 245, 248, 273 und 282.....	13
Abbildung 3: Verteilung der kolorektalen Adenom- bzw. ....	17
Abbildung 4: Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte von Exon 5 (205 bp, oben).	22
Abbildung 5: SSCP-Analyse Exon 8; WT = Wildtyp; links: Vergleich WT – Zelllinie SW 480 und HaCat; rechts: Verdünnungsreihe mit abnehmender SW480 Konzentration in der Wildtyp-DNA .....	28
Abbildung 6: links: Anteil der Mutationen im Patientenkollektiv n=38;.....	29
Abbildung 7: SSCP-Analyse Exon 5; Zelllinie Kle-1B, WT = Wildtyp,.....	30
Abbildung 8: SSCP-Analyse Exon 5; Zelllinie Kle-1B, WT = Wildtyp,.....	30
Abbildung 9: SSCP-Analyse Exon 6; Zelllinie Hut 78, WT = Wildtyp .....	31
Abbildung 10: SSCP-Analyse Exon 7; Zelllinie Hec-1B, WT = Wildtyp,.....	31
Abbildungen 11 : Verteilung der p53-Mutationen nach Karzinomgröße i.D., Daten aus Tabelle 13 .....	33
Abbildungen 12: Verteilung der p53-Mutationen nach Anzahl der Adenome, unabhängig von deren Größe, Daten aus Tabelle 14 .....	35
Abbildungen 13: Verteilung der p53-Mutationen nach Anzahl der Adenome $> 1$ cm i.D., Daten aus Tabelle 15 .....	37
Abbildungen 14: Verteilung der p53-Mutationen nach dem T-Stadium, Daten aus Tabelle 16 .....	39
Abbildungen 15: Verteilung der p53-Mutationen nach dem N-Stadium, Daten aus Tabelle 17 .....	41
Abbildungen 16: Verteilung der p53-Mutationen nach dem M-Stadium, Daten aus Tabelle 18 .....	43
Abbildung 17: Verteilung der positiven und negativen p53-Mutationen nach dem G-Stadium, Daten aus Tabelle 19 .....	45
Abbildungen 18: Verteilung der p53-Mutationen nach dem Patientenalter, Daten aus Tabelle 20 .....	46
Abbildungen 19: Verteilung der p53-Mutationen nach der Tumorlokalisation, Daten aus Tabelle 21 .....	48

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 Ahlquist DA; Fecal occult blood testing for colorectal cancer: can we afford to do this?; *Gastroenterol Clin North Am* 1997; 26: 41-55
- 2 Ahlquist DA, McGill DB, Fleming JL, Schwartz S, Wieand HS, Rubin J, et al; Patterns of occult bleeding in asymptomatic colorectal cancer; *Cancer* 1989; 63: 1826-1830
- 3 Ahlquist DA, Shuber AP; Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers; *Clinica Chimica Acta* 2002; 315: 157-168
- 4 Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN, Shuber AP; Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: Feasibility of a multitarget assay panel; *Gastroenterol* 2000; 119: 1219-1227
- 5 Ahlquist DA, Wieand HS, Moertel CG, McGill DB, Loprinzi CL, O'Connell MJ, et al; Accuracy of fecal occult blood screening for colorectal neoplasia: a prospective study using HemoQuant and Hemoccult; *JAMA* 1993; 269: 1262-1267
- 6 Atkin W, Martin JP; Stool DNA-Based Colorectal Cancer Detection: Finding the needle in the Haystack; *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 798-799
- 7 Atkin WS, Morson BC, Cuzick J; Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas; *N Engl J Med* 1992; 326: 658-662
- 8 Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, et al; Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas; *Science* 1989; 244: 217-221
- 9 Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B; p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis; *Cancer Res* 1990; 50: 7717-7722

- 10 Bang KM, Tillett S, Noar SK, et al; Sensitivity of fecal Hemoccult testing and flexible sigmoidoscopy for colorectal cancer screening; *J Occup Med* 1986; 28: 709-713
- 11 Bensen S, Mott LA, Dain B, Rothstein R, Baron J; The colonoscopic miss rate and true one-year recurrence of colorectal neoplastic polyps. Polyp prevention study group; *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 194-199
- 12 Biasco G, Paganelli GM, Miglioli M, Brillanti S, Di Febo G, Gizi G, et al; Rectal cell proliferation and colon cancer risk in ulcerative colitis; *Cancer Res* 1990; 50: 1156-1159
- 13 Borchers R, Heinzlmann M, Zahn R, Witter K, Martin K, Loeschke K, Folwaczny C; K-ras mutations in sera of patients with colorectal neoplasias and long-standing inflammatory bowel disease; *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 715-718
- 14 Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B; Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers; *Nature* 1987; 327: 293-297
- 15 Brandt LJ, Greenebaum E; Cytologic study of colonic lavage effluent in colonic adenocarcinoma; *Gastrointest Endosc* 1989; 35: 584-585
- 16 Bresalier RS, Kim SY; Malignant neoplasms of the large intestine; In: Sleisenger, Fordtran; *Gastrointestinal Disease*; eds. Scharschmidt BF, Feldman M, 5<sup>th</sup> Edition, Vol 2, WB Saunder Company, Philadelphia 1993, 1449-1493
- 17 Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR, Ozturk M; Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma; *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1973-1977
- 18 Byers T, Levin B, Rothenberger D, Dodd GD, Smith RA; American Cancer Society guidelines for screening and surveillance for early detection of colorectal polyps and cancer: update 1997. American Cancer Society Detection and Treatment Advisory Group on Colorectal Cancer; *CA Cancer J Clin* 1997; 47: 154-160

- 19 Caron de Fromental C, Soussi T; TP53 Tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis; *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 4: 1-15
- 20 Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagen DL, Carbone D, Piantadosi S, Koga H, et al; Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group; *Oncogene* 1990; 5: 1603-1610
- 21 Cole SR, Young GP; Dietary restriction impairs compliance with FOB screening for colorectal cancer; *Gastroenterology* 1999; 116: A391
- 22 Delattre P, Olschwang S, Law DJ, Melot T, Remvikos Y, Salmon RJ, Sastre X, Validire P, Feinberg AP, Thomas G; Multiple genetic alterations distinguish distal from proximal colorectal cancer; *Lancet* 1989; 2: 353-356
- 23 Demers RY, Stawick LE, Demers P; Relative sensitivity of the fecal occult blood test and flexible sigmoidoscopy in detecting polyps; *Prev Med* 1985; 14: 55-62
- 24 Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, et al; Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets; *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 858-865
- 25 Dowell SP, Wilson PO, Derias NW, Lane DP, Hall PA; Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens; *Cancer Res* 1994; 54: 2914-2918
- 26 Edelman GM; Morphoregulatory molecules; *Biochemistry* 1988; 27: 3533-3543
- 27 Eguchi S, Kohara N, Komuta K, Kanematsu T; Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer; *Cancer* 1996; 77: 1707-1710
- 28 Ekblom AM; Cancer risk in inflammatory bowel disease; *Can J Gastroenterology* 1995; 9: 23-26

- 29 Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M; Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells; *Nature* 1984; 312: 646-649
- 30 Fearon ER, Vogelstein B; A genetic model for colorectal tumorigenesis; *Cell* 1990; 61: 759-767
- 31 Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M; Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia; *Cancer Res* 1988; 48: 1159-1161
- 32 Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M; Detection of high incidence of k-ras oncogenes during human colon tumorigenesis; *Nature* 1987; 327: 298-303
- 33 Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, et al; A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer; *N Engl J Med* 1994; 331: 1669-1674
- 34 Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, et al; Nutritional factors and colon carcinoma: A case-control study involving French Canadians in Montreal, Quebec, Canada; *Cancer* 1997; 80: 858-864
- 35 Gordon IL, Rypins EB, Wuerker RB, Jakowatz JJ; Cytologic detection of colorectal cancer after administration of oral lavage solution; *Cancer* 1991; 68: 106-110
- 36 Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al; Identification and characterisation of the familial adenomatous polyposis coli gene; *Cell* 1991; 66: 589-600
- 37 Guillem JG, Forde KA, Trect MR, et al; Colonoscopic screening for neoplasms in asymptomatic first-degree relatives of colon cancer patients. A controlled, prospective study; *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 523-529
- 38 Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jegou N, Asselain A, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G; Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer; *Gastroenterology* 1994; 106: 42-48

- 39 Handy LM, Ghosh S, Ferguson A; Investigation of neutrophil migration into the gut by cytology of whole gut lavage fluid; *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 53-58
- 40 Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, et al; Randomised controlled trial of fecal occult blood screening for colorectal cancer; *Lancet* 1996; 348: 1472-1477
- 41 Hasegawa Y, Takeda S, Ichii S, Koizumi K, Maruyama M, Fujii A, et al; Detection of k-ras mutations in DNAs isolated from feces of patients with colorectal tumors by mutant-allele-specific amplification (MASA); *Oncogene* 1995; 10: 1441-1445
- 42 Heinzlmann M, Lang SM, Neynaber S, Reinshagen M, Emmrich J, Stratakis DF, Heldwein W, Wiebecke B, Loeschke K; Screening for p53 and k-ras mutations in whole-gut lavage in chronic inflammatory bowel disease; *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 1061-1066
- 43 Heinzlmann M, Neynaber S, Heldwein W, Folwaczny C; K-ras and p53 mutations in colonic lavage fluid of patients with colorectal neoplasias; *Digestion* 2001; 63: 229-233
- 44 Hinds PW, Finlay C, Levine AJ; Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation; *J Virol* 1989; 63: 739-746
- 45 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC; p53 Mutations in Human Cancers; *Science* 1991; 253: 49-53
- 46 Jahn H, Joergensen OK, Kronborg O, et al; Can Hemoccult II replace colonoscopy after radical surgery for colorectal cancer or after polypectomy?; *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 253-256
- 47 Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig, RW; Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage; *Cancer Res* 1991; 51: 6304-6311

- 48 Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR; Clinical and pathologic associations with allelic loss in colorectal carcinoma; JAMA 1989; 261: 3099-3103
- 49 Knudson AG; Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes; Cancer Res 1985; 45: 1437-1443
- 50 Kronberg O, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sondergaard O; Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal occult blood test; Lancet 1996; 348: 1467-1471
- 51 Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA; Cancer statistics 1998; CA Cancer J Clin 1998; 48: 6-29
- 52 Lang SM, Heinzlmann M, Stratakis DF, Teschauer W, Loeschke K; Detection of Ki-ras mutations and differential hybridization and of p53 mutations by SSCP analysis in endoscopically obtained lavage solution from patients with long-standing ulcerative colitis; Am J Gastroenterol 1997; 92: 2166-2170
- 53 Lang SM, Stratakis DF, Heinzlmann M, Heldwein W, Wiebecke B, Loeschke K; Molecular screening of patients with long-standing extensive ulcerative colitis: Detection of p53 and Ki-ras mutations by single strand confirmation polymorphism analysis and differential hybridization in colonic lavage fluid; Gut 1999; 44: 822-825
- 54 Livingstone LR, et al; Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of Wild-Type p53; Cell 1992; 70: 923-935
- 55 Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE; p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents; Cell 1993; 74: 957-967
- 56 Mandel JS, Bond JH, Bradley M, et al; Sensitivity, specificity, and positive predictive value of the Hemoccult test in screening for colorectal cancers; Gastroenterology 1989; 97: 597-600

- 57 Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, et al; Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood; Minnesota Colon Cancer Control Study; *N Engl J Med* 1993; 328: 1365-1371
- 58 Miller CW, Aslo A, Tsay C, Slamon D, Ishizaki K, Toguchida J, Yamamuro T, Lampkin B, Koeffler HP; Frequency and structure of p53 rearrangements in human osteosarcoma; *Cancer Res* 1990; 50: 7950-7954
- 59 Miller DG; On the nature of susceptibility to cancer. The presidential address; *Cancer* 1980; 46: 1307-1318
- 60 Muller AD, Sonnenberg A; Prevention of colorectal cancer by flexible endoscopy and polypectomy. A case-control study of 32,702 veterans; *Ann Intern Med* 1995; 123: 904-910
- 61 Muller AD, Sonnenberg A; Protection by endoscopy against death from colorectal cancer. A case-control study among veterans; *Arch Intern Med* 1995; 155: 1741-1748
- 62 Murakami Y, Hayashi K, Sekiya T; Detection of aberrations of the p53 alleles and the gene transcript in human tumor cell lines by single-strand conformation polymorphism analysis; *Cancer Res* 1991; 51: 3356-3361
- 63 Newcomb PA, Norfleet RG, Storer BE, Surawicz TS, Marcus PM; Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality; *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1572-1575
- 64 Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al; Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types; *Nature* 1989; 342: 705-708
- 65 Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P; Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients; *Science* 1991; 253: 665-669

- 66 Ookawa K, Sakamoto M, Hirohashi S, Yoshida Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J; Concordant p53 and DCC alterations and allelic losses in chromosomes 13q and 14q associated with liver metastases of colorectal carcinoma; *Int J Cancer* 1993; 53: 382-387
- 67 Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T; Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms; *Proc nat Acad Sci* 1989; 86: 2766-2770
- 68 Otchy DP, Ransohoff DF, Wolff BG, et al; Metachronous colon cancer in persons who have had a large adenomatous polyp; *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 448-454
- 69 Pietenpol JA, et al; Sequence-Specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53; *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1998-2002
- 70 Potter MA, Morris RG, Ferguson A, Wyllie AH; Detection of mutations associated with colorectal cancer in DNA from whole-gut lavage fluid; *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 623-626
- 71 Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay J, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW; APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis; *Nature* 1992; 359: 235-237
- 72 Rex DK, Lehmann GA, Ulbright TM, Smith JJ, Hawes RH; The yield of a second screening flexible sigmoidoscopy in average risk persons after one negative examination; *Gastroenterology* 1994; 106: 593-595
- 73 Ribet A, Frexinos J, Escourrou J, et al; Occult blood tests and colorectal tumors; *Lancet* 1980; 1: 417-421
- 74 Robinson MHE, Kronborg O, Williams CB, et al; Faecal occult blood testing and colonoscopy in the surveillance of subjects at high risk of colorectal neoplasia; *Br J Surg* 1995; 82: 318-320

- 75 Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP; p53 mutations in colorectal cancer; Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 7555-7559
- 76 Rozen P; Screening for colorectal neoplasia in the Tel Aviv area: cumulative data 1979-89 and initial conclusions; Isr J Med Sci 1992; 28: 8-20
- 77 Rozen P, Tobi M, Darmon E, Kaufman L; Exfoliative colonic cytology. A simplified method of collection and initial results; Acta Cytol 1990; 34: 627-631
- 78 Saleh HA, Aburashed A, Bober P, Tabaczka P; P53 protein immunohistochemical expression in colonic adenomas with and without associated carcinoma; Am J Gastroenterol 1998; 93: 980-984
- 79 Sasaki M, Okamoto M, Sato C, Sugio K, Soejima J, Iwama T, Ikeuchi T, Tanomura A, Miyaki M, Sasazuki T; Loss of constitutional heterozygosity in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli and those with non-polyposis colorectal carcinoma; Cancer Res 1989; 49: 4402-4406
- 80 Schmiegel W, Adler G, Frühmorgen P, Fölsch U, Graeven U, Layer P, Petrasch S, Porschen R, Pox C, Sauerbruch T, Schmoll H-J, Zeitz M; Kolorektales Karzinom: Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung – Vorsorge bei Risikopatienten – Endoskopische Diagnostik, Therapie und Nachsorge von Polypen und Karzinomen; Z Gastroenterol 2000; 38: 49-75
- 81 Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP, Weiss NS; A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer; N Engl J Med 1992; 326: 653-657
- 82 Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, et al; Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors; Science 1992; 256: 102-105
- 83 Slattery ML, Schumacher MC, Smith KR, West DW, Abd-Elghany N; Physical activity, diet and risk of colon cancer in Utah; Am J Epidemiol 1988; 128: 989-999

- 84 Smith ML, et al; Interaction of the p53-regulated protein gadd45 with proliferating cell nuclear antigen; Science 1994; 266: 1376-1380
- 85 Soussi T, Beroud C; Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome; Nat Rev Cancer 2001; 1: 233-240
- 86 Soussi T, Gallou C, Beroud C; The p53-Database; <http://p53.curie.fr/> 2001
- 87 Soussi T; The p53 tumor suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer; Mol Med Today 1996; 2: 32-37
- 88 Soussi T; The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation; Molecular Genetics of Cancer 1995; 135-178
- 89 Statistisches Bundesamt; Statistisches Jahrbuch 1998; Stuttgart, Metzler-Poeschel, 1998
- 90 Sugarbaker JP, Gunderson LL, Wittes RE; Colorectal cancer; In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA; eds. Cancer: principles and practices of oncology, 2<sup>nd</sup> edition Philadelphia: JB Lippincott 1985; 800-803
- 91 Tessitore A, Di Rocco ZC, Cannita K, Ricevuto E, Toniato E, Tosi M, Ficorella C, Frati L, Gulino A, Marchetti P, Martinotti S; High sensitivity of detection of TP53 somatic mutations by fluorescence-assisted mismatch analysis; Genes Chromosomes Cancer 2002; 35: 86-91
- 92 Tobi M, Luo FC, Ronai Z; Detection of K-ras mutations in colonic effluent samples from patients without evidence of colorectal carcinoma; Reports J Nat Cancer Institute 1994; 86: 1007-1010
- 93 Török HP, Glas J, Folwaczny C; Vom Haemoccult zum Genocult ?; Z Gastroenterol 2003; 41: 347-350
- 94 Toribara NW, Sleisenger MH; Screening for colorectal cancer; N Engl J Med 1995; 332: 861-867

- 95 Ueno I, Ota H, Hidaka E, Ishikawa M, Hirota M, Nara K, Katsuyama T; The comparison of sensitivity between immunostaining and a simplified PCR-cold SSCP method in p53 genomic mutations; *Rinsho Byori* 2000; 48: 469-472
- 96 Van Stolck RU, Beck GJ, Baron JA, Haile R, Summers R; Adenoma characteristics at first colonoscopy as predictors of adenoma recurrence and characteristics at follow-up; The Polyp Prevention Study Group; *Gastroenterology* 1998; 115: 13-18
- 97 Villa E, Dugani A, Rebecchi AM, Vignoli A, Grottola A, Buttafoco P, et al; Identification of subjects at risk for colorectal carcinoma through a test based on K-ras determination in the stool; *Gastroenterology* 1996; 110: 1346-1353
- 98 Vogelstein B; Cancer. A deadly inheritance; *Nature* 1990; 348: 681-682
- 99 Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL; Genetic alterations during colorectal-tumor development; *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532
- 100 Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R; Allelotype of colorectal carcinomas; *Science* 1989; 244: 207-211
- 101 Vogelstein B, Kinzler KW; p53 Function and Dysfunction; *Cell* 1992; 70: 523-526
- 102 West DW, Slattery ML, Robinson LM, et al; Dietary intake and colon cancer: Sex- and anatomic site-specific associations; *Am J Epidemiol* 1989; 130: 883-894
- 103 Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE; Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women; *N Engl J Med* 1990; 323: 1664-1672
- 104 Williams CB, Macrae FA, Bartram CI; A prospective study of diagnostic methods in adenoma follow up; *Endoscopy* 1982; 14: 74-78
- 105 Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, et al; Colorectal cancer screening: Clinical guidelines and rationale; *Gastroenterology* 1997; 112: 594-642

- 106 Winther JF; Dreyer L, Overvad K, Tjonneland A, Gerhardsson de Verdier M; Avoidable cancers in the Nordic countries. Diet, obesity and low physical activity; *APMIS* 1997; 76: 100-119
- 107 Yamashita N, Minamoto T, Ochiai A, Onda M, Esumi H; Frequent and characteristic K-ras activation and absence of p53 protein accumulation in aberrant crypt foci of the colon; *Gastroenterology* 1995; 108: 434-440
- 108 Yao T, Kajiwara M, Kouzuki T, Iwashita A, Tsuneyoshi M; Villous tumor of the colon and rectum with special reference to roles of p53 and bcl-2 in adenoma-carcinoma sequence; *Pathol Int* 1999; 49: 374-382
- 109 Yin YX, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM; Wild-Type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles; *Cell* 1992; 70: 937-948
- 110 Yonish-Rouach E, et al; Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6; *Nature* 1991; 352: 345-347
- 111 Zhu P, Keohavong P, Finkelstein SD, Swalsky P, Bakker A, Weissfeld J, Srivastava S, Whiteside TL; K-ras gene mutation in normal colorectal tissues from K-ras mutation-positive colorectal cancer patients; *Cancer Res* 1997; 57: 2485-2492

## **9. Danksagung**

Herrn PD Dr. C. Folwaczny danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die konstruktive Führung und Betreuung der Arbeit und für die geduldige Korrektur der Aufzeichnungen.

Frau Dr. H. Török danke ich herzlichst für die vorbildliche Betreuung und Einsatzbereitschaft. Sie zeigte nicht nur größte fachliche Kompetenz in allen praktischen und theoretischen Fragen sondern wusste immer auch aufmunternde Worte in problematischen Lagen.

Herrn Dr. J. Glas danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und für die kompetente Hilfeleistung bei allen Fragen und Problemen.

Herrn Prof. Dr. W. Schmitt und Herrn Dr. M. Dollhopf danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Patientenerhebung.

Meiner Mutter möchte ich für die liebevolle Unterstützung und für ihr uneingeschränktes Vertrauen während meiner Studienjahre danken.

## 10. Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

---

Name:	Michael Braun
Geburtsdatum / -ort:	16.08.1975 / München
Familienstand:	Ledig
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Eltern:	Anita Braun, Fotografin Reinhard Braun, Fotograf

### **Schulbildung:**

---

09 / 1982 – 07 / 1986	Grundschule Neukeferloh
09 / 1986 – 07 / 1989	Privatgymnasium Dr. Florian Überreiter
09 / 1989 – 07 / 1996	Gymnasium Vaterstetten Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Zivildienst:**

---

09 / 1996 – 09 / 1997	Psychiatrische Aufnahmestation Bezirkskrankenhaus Haar
-----------------------	---

### **Hochschulbildung:**

---

10 / 1997 – 09 / 2003	Studium der Humanmedizin Ludwig-Maximilians-Universität München
03 / 2000	Ärztliche Vorprüfung
08 / 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09 / 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10 / 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Praktisches Jahr:**

---

10 / 2003 – 02 / 2004	Innere Medizin – Akutgeriatrie Städt. Krankenhaus München-Neuperlach
02 / 2004 – 05 / 2004	Anästhesiologie und Intensivmedizin Klinikum Traunstein
05 / 2004 – 09 / 2004	Chirurgie – Abdomen, Gefäße Städt. Krankenhaus München-Neuperlach

### **Ärztliche Tätigkeit:**

---

Seit 02 / 2005	Assistenzarzt im Fachbereich Anästhesiologie und operative Intensivmedizin Rot-Kreuz-Krankenhaus München
----------------	--