

Aus der Medizinischen Klinik, Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

**Nachweis und Sequenzierung von p53- und ki-ras-Mutationen in der Kolonlavage  
sowie Autoantikörpern gegen p53 im Serum bei Adenomen des Kolons und  
langjährigen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sven Neynaber

aus

Eutin

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. C. Folwaczny

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Lamerz

Prof. Dr. A. Schalhorn

Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. M. Heinzlmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2003

Teile dieser Doktorarbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

„K-ras and p53 Mutations in Colonic Lavage Fluid of Patients with Colorectal Neoplasias“

Heinzlmann M, Neynaber S, Heldwein W, Folwaczny C.

Digestion 2001; 63: 229-33

„Screening for p53 and K-ras mutations in whole-gut lavage in chronic inflammatory bowel disease“

Heinzlmann M, Lang SM, Neynaber S, Reinshagen M, Emmrich J, Stratakis DF, Heldwein W, Wiebecke B, Loeschke K.

Eur J Gastroenterol Hepatol 2002;14: 1061-1066

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms und Problemstellung	7
1.2. Risikogruppen	11
1.2.1. Adenome	11
1.2.2. Langjährige chronisch entzündliche Darmerkrankungen	13
1.3. Dysplasiegrad	15
1.4. Molekularbiologie	17
1.4.1. Maligne Transformation	17
1.4.2. Karzinogenese	17
1.4.3. p53-Tumorsuppressor Gen	21
1.4.4. ki-ras Onkogen	24
<b>2. Fragestellung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>3. Methodik</b>	<b>26</b>
3.1. Patienten	26

3.2. Probengewinnung	27
3.3. Aufbereitung und DNA-Extraktion	28
3.4. DNA-Amplifikation	29
3.5. Agarosegel-Elektrophorese	34
3.6. Mutationsanalyse	35
3.6.1. Hybridisierung von Dot-blots	35
3.6.2. SSCP-Analyse	42
3.7. Sequenzierung	46
3.8. Bestimmung der p53-Autoantikörper im Serum	48
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>49</b>
4.1. Adenome	49
4.2. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	52
4.3. Mutationsanalyse der Adenom- und CED-Population	54
4.4. p53-Autoantikörper im Serum	58
4.5. Sequenzierung	58
<b>5. Diskussion</b>	<b>59</b>

<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>85</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms und Problemstellung

Das kolorektale Karzinom weist eine ansteigende Inzidenz von zur Zeit etwa 30-60 auf 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland auf. Es gehört mit dem Bronchialkarzinom und dem Mamakarzinom zu den häufigsten Malignomen weltweit (20). Die Mortalität ist in den letzten 50 Jahren nicht wesentlich gesunken (18).

Die Inzidenzrate divergiert in verschiedenen ethnischen beziehungsweise rassischen Gruppen. Verglichen mit anderen US-Bürgern weisen beispielsweise Ureinwohner Alaskas eine hohe Rate an kolorektalen Karzinomen auf (62). Migrationsstudien konnten zeigen, dass das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken nicht ausschließlich genetisch bedingt ist, sondern durch exogene Faktoren wesentlich bestimmt wird. Dennoch lassen sich für nur etwa 25% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom definierte Risikofaktoren eruieren. So spielen neben dem Alter langjähriger Nikotinabusus, körperliche Bewegung (92), das Körpergewicht, sowie Ernährungsfaktoren eine Rolle. Die Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS, 85) empfiehlt eine ausgewogene Ernährung, die insbesondere arm an Fleisch- und Fettkonsum sowie reich an Fasern ist (34, 42). Allerdings ist ein eindeutiger Zusammenhang zwischen exogenen Faktoren und dem Erkrankungsrisiko aus den derzeitigen Studien nicht ableitbar.

Manifeste Karzinome treten

- sporadisch auf,
- als Folge von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder

- sind genetisch determiniert, was in dieser Studie nicht untersucht wurde.

Zur ersten Gruppe gehören Patienten mit Adenomen sowie Verwandte von Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen. Bezüglich chronisch entzündlicher Darmerkrankungen gehört primär die Colitis ulcerosa zu dieser Gruppe. Das Risiko der Karzinomentstehung bei langjährigem Morbus Crohn ist noch unzureichend charakterisiert, aber geringer einzustufen.

Zum Screening kolorektaler Karzinome werden verschiedene Verfahren eingesetzt. Eine kostengünstige, schnell und einfach durchzuführende Methode ist der Haemocult®-Test (102). Es wird die Pseudoperoxidaseaktivität des Hämoglobins aus Fäzes nachgewiesen, so dass er bei Blutverlusten über 30 ml/ Tag in über 50 % positiv ausfällt. Der Haemocult®-Test weist eine relativ niedrige Spezifität mit falsch positiven Ergebnissen, zum Beispiel aufgrund von peroxidasehaltiger Nahrung (rohes Fleisch, frisches Obst, Gemüse) auf. Die Sensitivität bei Patienten mit kolorektalen Adenomen beträgt zwischen 20 und 40 %, bei manifesten Karzinomen 50 % (46) und ist deshalb unbefriedigend, da 40–50 % aller kolorektalen Neoplasien somit nicht durch den Haemocult®-Test detektiert werden(46). Auch sind die Ergebnisse dieses Tests bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht verwertbar, da es hierbei zu Blutverlusten kommt, die mit der entzündlichen Aktivität und nicht mit möglichen Neoplasien im Zusammenhang stehen. Jedoch reduziert der Haemocult®-Test bei regelmäßiger, konsequenter Anwendung die Mortalität um 23 % bei asymptomatischen Patienten (95).

Eine sensitivere Methode der Früherkennung stellt die Koloskopie dar. Mittels flexibler Sigmoidoskopie lässt sich die Mortalität um bis zu 80 % senken (64, 65, 67, 86). Vorteile dieser Untersuchung ergeben sich aus der Möglichkeit, die Schleimhaut exakt zu beurteilen, Gewebeproben an verschiedenen Stellen des Darms für die Histologie zu gewinnen und die prophylaktische Abtragung von Polypen durchzuführen. Das invasive Verfahren der Koloskopie und die unter Umständen entstehenden Schmerzen sowie die hierfür



notwendige Reinigung des Darms schränken die Bereitschaft und Akzeptanz, sich einer Darmspiegelung zu unterziehen, ein (8, 77). Eine genaue Indikationsstellung zur Koloskopie ist auch wegen der entstehenden hohen Kosten wichtig, da diese zu einer großen ökonomischen Belastung des Gesundheitswesens führen würden.

Aufgrund von Haustrien und Windungen kann der Untersucher bei der Koloskopie Bereiche übersehen, in denen sich Adenome oder andere prämaligne Veränderungen befinden können, zum Beispiel eine „Dysplasia associated lesion or mass“ (DALM) bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Etwa 15 % kolorektaler Adenome werden bei einer Koloskopie übersehen, insbesondere bei Patienten mit multiplen Adenomen (14, 79).

Trotz der genannten Limitierungen ist die Koloskopie bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die wichtigste diagnostische Methode zur Karzinomprophylaxe. Die histologische Untersuchung von Gewebeproben ermöglicht eine Aussage über prämaligne Veränderungen der betroffenen Areale, weist jedoch folgende Erscheinungen auf:

- es wird nur ein sehr geringer Anteil der gesamten Mukosa erfasst
- die Biopsieentnahme erfolgt mit der Ausnahme makroskopisch suspekter Areale (DALM) rein zufällig
- multifokal wachsende Dysplasien werden möglicherweise nicht erfasst
- bei dem Nachweis einer Dysplasie kann an anderer Stelle bereits ein Karzinom vorliegen und
- unter antiinflammatorischer Therapie können sich niedriggradige Dysplasien zurückbilden.

Die therapeutische Möglichkeit eines invasiven Karzinoms ist durch die zur Zeit möglichen Therapieverfahren (verschiedene Operationstechniken, Chemotherapeutika, Radiatio bei Rektumkarzinomen) besser geworden. Die 5-Jahresüberlebensrate ist jedoch noch immer bei weitem nicht befriedigend, im UICC-Stadium II liegt sie knapp über 50 % und in den Stadien III sowie IV bei etwa 40 beziehungsweise 5 %. Insbesondere hat eine frühe Diagnosestellung einen signifikant günstigen Einfluss auf die Prognose von Tumoren und stellt den wichtigsten Schritt in der Primärprophylaxe dar.

Da die Ergebnisse von bisherigen Screeningverfahren zur Erkennung von frühen beziehungsweise Vorstadien von Darmkarzinomen Schwächen aufweisen und nicht ausreichend sensitiv und spezifisch sind, ist es erstrebenswert, andere diagnostische Methoden zu erforschen und zu etablieren. Molekularbiologische Verfahren könnten hier einen Ansatz als Ergänzung zu den bisherigen Methoden darstellen. Die Detektion von Mutationen der Protoonkogene und Tumorsuppressorgene, die in der Entstehung von Kolonkarzinomen eine wichtige Rolle spielen, können eine sinnvolle Ergänzung zu den bisherigen Methoden sein, da sie schon vor der Entwicklung zu einem invasivem Karzinom, wenn eine Dysplasie vorliegt, untersucht werden können. Dieses betrifft insbesondere sporadisch entstehende Polypen, bei denen keine Grundkrankheit eruierbar ist, sowie auch langjährige chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

## 1.2 Risikogruppen

### 1.2.1 Adenome

Das Adenom des Kolons ist im höheren Lebensalter relativ häufig (bei > 60jährigen in ca. 20 % der Fälle). Zumeist treten solitäre Polypen auf, die im gesamten Kolon lokalisiert sein können, in den distalen Abschnitten jedoch am häufigsten zu finden sind.

Adenome werden in tubuläre, tubulo-villöse und rein villöse Formen unterteilt. 75 % aller Kolonpolypen weisen makroskopisch eine glatte Oberfläche auf. Es besteht ein nur geringes Potential, maligne zu transformieren. Tubulo-villöse Adenome haben eine Häufigkeit von 15 %, weisen makroskopisch eine zottige Oberfläche auf und treten gestielt oder breitbasig in das Darmlumen hervor. Sie entarten häufiger als die rein tubulären Adenome. Das größte Karzinomrisiko geht von villösen Adenomen aus (114). Sie treten mit 10 % am seltensten auf und wachsen breitbasig mit einer zottigen Oberfläche.

Von Bedeutung für das Entartungsrisiko ist neben der Histopathologie die Größe von kolorektalen Adenomen. Über 1 cm Größe sind villöse Adenome mit einem etwa vierfach erhöhten Karzinomrisiko assoziiert (9, 56, 72, 105). Auch bei multiplen Adenomen ist das Risiko, ein Karzinom zu entwickeln, deutlich (circa sechsfach) gesteigert und auch Patienten mit resezierten Adenomen haben ein erhöhtes Risiko, ein weiteres Adenom oder ein Karzinom zu entwickeln (9, 72, 105).

Da der makroskopische Aspekt nur bedingt eine Aussage über die Dignität der Polypen erlaubt, wird die Resektion in toto angestrebt. Das weitere Procedere richtet sich neben dem Dysplasiegrad beziehungsweise dem Nachweis eines Malignoms danach, ob die Exzision im Gesunden erfolgte und ob bereits eine Invasion in Lymphgefäße

stattgefunden hat. In Abhängigkeit von diesen Faktoren wird die Indikation zu einem chirurgischen Vorgehen beziehungsweise zu einer endoskopischen Nachkontrolle gestellt.

Die Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAP) und Acetylsalicylsäure wirkt möglicherweise tumorprotektiv (91, 63) aufgrund induzierter Apoptose in Kolonadenomen, länger dauernder Ruhe im Zellzyklus (3) sowie Inhibition von potentiell karzinogenen, oxidativen DNA-Effekten und Reparatur von DNA-Schäden (5). Es gibt zwei Isoformen der Cyclooxygenase (31, 63). Während die Cyclooxygenase I für die Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen notwendig ist, ist die Cyclooxygenase II eine induzierbare Form, die wie die Prostaglandine (das Substrat der Cyclooxygenase) in erhöhter Konzentration in entzündlichem, prämaligmen und malignem Gewebe nachzuweisen ist. Die Hemmung der Cyclooxygenase II scheint hier einen wichtigen Einfluss auf die Tumorgeneschmung zu haben. Die Heraufregulierung der Cyclooxygenase II kann häufig bei vorliegenden Mutationen im ki-ras Gen gefunden werden, so dass diese Mutationen eventuell eine wichtige Rolle in der Induktion von Cyclooxygenase II spielt (31, 63). Klinische Untersuchungen zeigten, dass das nicht-steroidale Antiphlogistikum Sulindac zu einer deutlichen Regression von Adenomen bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis führte (3, 31).

## 1.2.2 Langjährige chronisch entzündliche Darmerkrankungen

### Colitis ulcerosa (CU)

Die Colitis ulcerosa ist eine Erkrankung des Dickdarmes mit kontinuierlicher Ausbreitung. Die Inzidenz schwankt zwischen 1 und 15 Erkrankten/Jahr auf 100.000 Einwohner. In Skandinavien sowie den USA bestehen die höchsten Inzidenzraten. Die Prävalenz der Colitis ulcerosa schwankt zwischen etwa 30 und 115 pro 100.000 Einwohner.

Bei langjährigem Krankheitsverlauf besteht eine erhöhte Gefahr der malignen Transformation in ein kolorektales Karzinom (37, 55, 75). Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und maligner Transformation weisen in der Regel ein jüngeres Alter als Patienten mit sporadischen kolorektalen Karzinomen auf. Das Risiko der malignen Transformierung hängt vom Alter bei Erstdiagnose, von der Dauer der Erkrankung, vom Ausmaß des Kolonbefalls (besonders gefährdet sind Patienten mit Pankolitiden und Patienten mit Befall des terminalen Ileums, sogenannter „backwash ileitis“), der Compliance, der Art und dem Ansprechen der Therapie und auch somit der Häufigkeit der entzündlichen Schübe ab. Während die distale Colitis ulcerosa kein erhöhtes Risiko birgt, besteht bei einer linksseitigen CU nach etwa 15 Jahren, bei der Pankolitis nach 7–10 Jahren ein erhöhtes Risiko der malignen Entartung. Bei zusätzlicher primärer sklerosierender Cholangitis ist das Risiko besonders hoch. Nach 25jährigem Krankheitsverlauf kann das mittlere Karzinomrisiko mit ca. 10 % angegeben werden (28, 29, 36, 37, 47). Während frühere epidemiologische Angaben (1966-1990) noch von höheren Karzinomrisiken (40-50 %) bei Patienten ab 30 Jahren Krankheitsdauer CU sprachen, sind die heutigen Daten nach 30 Jahren Krankheitsdauer deutlich niedriger (9–16 %). Gründe hierfür können sein, dass sich das Patientengut in den einzelnen Studien unterscheidet, dass der Anteil von voroperierten Patienten variiert und die Diagnose möglicherweise in einigen Fällen nicht zutreffend gestellt wird. Der wahrscheinlich

wichtigste Aspekt dabei ist jedoch die verbesserte medikamentöse Therapie. Der Einsatz von 5-Aminosalizylsäure-Präparaten wirkt möglicherweise durch antioxidative Eigenschaften und über die antiinflammatorische Aktivität tumorprotektiv. Die Hemmung der Cyclooxygenase scheint in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle zu spielen (3). Weitere Wirkungen, die nicht unmittelbaren Einfluss auf die Tumorgenese haben, sind die Hemmung der Lipoxygenase-Aktivität von aktivierten neutrophilen Zellen, die Bildung der Zytokine Interleukin-1 und Interleukin-6 in der Darmmucosa, die Bildung der Interleukin-2-Rezeptoren und Hemmung des Plättchen-aktivierenden Faktors.

### Morbus Crohn (MC)

Morbus Crohn assoziierte Karzinome können im gesamten Darmbereich auftreten. Ähnlich der Colitis ulcerosa spielt die kummulative Krankheitsdauer und die Summe aus Flächenausdehnung und Krankheitsjahren einen entscheidenden Faktor bei der Tumorgenese. Maligne transformierte Bereiche treten nicht selten in entzündlichen oder postentzündlichen Stenosen auf, wurden aber auch unabhängig von entzündlichen oder narbigen Veränderungen beschrieben. Aufgrund neuerer Untersuchungen wird das Risiko für die Entstehung eines Crohn assoziierten Kolonkarzinoms kontrovers diskutiert und einige Studien zeigen, dass kein signifikant erhöhtes Risiko besteht (41, 49). Ähnlich der Colitis ulcerosa hat sich aufgrund der verbesserten Diagnostik und Therapie das Risiko der Tumorgenese im Vergleich zu vergangenen Jahren wahrscheinlich verringert. In der überwiegenden Zahl an Untersuchungen liegt das Risiko unter 1 %, im Laufe des Lebens ein kolorektales Karzinom zu entwickeln.

### 1.3 Dysplasiegrad

Histologisch werden Adenome und Gewebeproben von Patienten mit CED nach dem Dysplasiegrad beziehungsweise danach, ob eine Dysplasie besteht oder nicht, eingeteilt.

Dysplasien sind Differenzierungsstörungen des Plattenepithels und stellen primär eine reversibel veränderbare, kontrollierte Zellproliferation dar, die den Präkanzerosen zuzuordnen sind. Sie sind definiert als eindeutige neoplastische Transformation des Epithels.

Die Dysplasien der kolorektalen Adenome werden in zwei Grade eingeteilt. Bei geringgradigen Dysplasien sind die Veränderungen reversibel und meist Zeichen gesteigerter Regeneration. Es liegen Reifungsstörungen vor. Hochgradige Dysplasien stellen ein intraepitheliales Karzinom dar, in dem die Zellen entdifferenzieren. Hier findet sich innerhalb der Mukosa ohne Durchbruch der Muscularis mucosae eine Ansammlung von Drüsenschläuchen. Sobald die Lamina muscularis mucosae von den atypischen Drüsen durchzogen ist, liegt ein mikroinvasives Adenokarzinom vor (80). Dysplasien weisen auf ein bevorstehendes, aber noch nicht entstandenes Karzinom hin und sind als „Vorläufer“ dieser zu deuten. Klinisch können sie ein Hinweis auf ein andernorts bereits entstandenes Karzinom sein.

Es ist vor wenigen Jahren zu einer Änderung der Nomenklatur bezüglich der Dysplasie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bei kolorektalen Adenomen gekommen. Nach der alten Nomenklatur wurden die Dysplasien in drei Grade eingeteilt, geringgradige, mittelgradige und hochgradige Dysplasien. Jetzt werden bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zwei Kategorien unterschieden: keine und positive Dysplasien. Bei der initialen Dysplasie sind reguläre Zellkerne meist in der Basalhälfte der Zellen zu finden, bei der fortgeschrittenen Dysplasie zeigen sich verlängerte Zellkerne, meist im superfiziellen,

luminalseitigen Anteil der Zellen und es werden Hyperchromasien, Zellpleomorphismen und Verlust der Kernpolarität nachgewiesen.

In weniger als 10 % werden histologisch dysplastische und makroskopisch gleichzeitig suspekta Bereiche, sogenannte „Dysplasia associated lesion or mass“ (DALM) bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gefunden. Bei diesen meist erhabenen Arealen mit scharfen oder unscharfen Begrenzungen liegt in über 50 % der Fälle ein invasives Karzinom vor, weshalb bei den mit einem besonders hohem Karzinomrisiko assoziierten Veränderungen eine Proktokolektomie erfolgen sollte.

Makroskopisch können Dysplasien unauffällig bleiben, wenn sie im Schleimhautniveau in Richtung Serosa wachsen („flat adenoma“). Bei der Koloskopie werden diese Bereiche häufig als unauffällig eingestuft. Im Rahmen der Karzinomprophylaxe werden in bestimmten zeitlichen Abständen alle 10-12 cm „Stufenbiopsien“, in der Regel vier Biopsien aus allen Quadranten (Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens, Sigma), entnommen, um eine möglichst genaue Aussage zur Histologie treffen zu können.

Histologisch entsprechen die mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten Karzinome meist gering differenzierten Adenokarzinomen. Patienten mit Colitis ulcerosa mit manifestem Karzinom weisen fast immer zusätzlich präkanzeröse Epithelläsionen auf, entweder am Rand invasiver Tumore oder multifokal, fern anderer dysplastischer Bereiche oder Karzinome. Colitis ulcerosa assoziierte Karzinome treten nicht selten an mehreren Stellen gleichzeitig auf, so dass Patienten mit Nachweis eines auffälligen Befundes mit histologisch gesicherter Dysplasie in der Regel kolektomiert werden müssen. Epitheldysplasien treten meist einige Jahre vor einem manifesten Karzinom auf.



## 1.4 Molekularbiologie

### 1.4.1 Maligne Transformation

Ein kolorektales Karzinom entwickelt sich aus Epitheldysplasien. Je nach Stadium können der histologischen „Adenom- (Dysplasie-) Karzinom-Sequenz“ molekularbiologische Veränderungen bestimmter Tumorsuppressor- oder Onkogene zugeordnet werden. Die mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten Karzinome unterscheiden sich von den sporadischen auch in dieser Hinsicht.

Die Tumorgenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten kolorektalen Karzinomen verläuft wahrscheinlich nicht nach der Adenom-Karzinom-Sequenz. Es ist insbesondere noch nicht bekannt, in welcher Reihenfolge bestimmte Gene dabei mutieren oder ob überhaupt eine feste Abfolge genetischer Veränderungen nachweisbar ist.

### 1.4.2 Karzinogenese

Bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen gibt es molekulargenetische Veränderungen, die von Bedeutung sind und eindeutig mit der Karzinogenese in Zusammenhang stehen (38). Durch Untersuchungen von Gewebeproben konnte eine

Reihe an genetischen Mutationen von dysplastisch bis maligne entarteten Arealen identifiziert werden. Der Tumorprogress kann nach einem Modell von Vogelstein in einen zeitlichen Ablauf durch die Art des Allelverlustes, beziehungsweise der Mutation von am Tumorprozess beteiligten Genen eingeteilt werden. Der Nachweis bestimmter molekulargenetischer Abweichungen von histologisch tumorfreiem Gewebe am Rand von Karzinomen, in dem Dysplasien bioptisch gesichert sind, und der Vergleich dieser mit Mutationen aus Anteilen mit karzinomatöser Entartung sowie longitudinale Beobachtungen von Arealen mit Dysplasien sind Grundlage dieses Modells (siehe Abbildung 1).

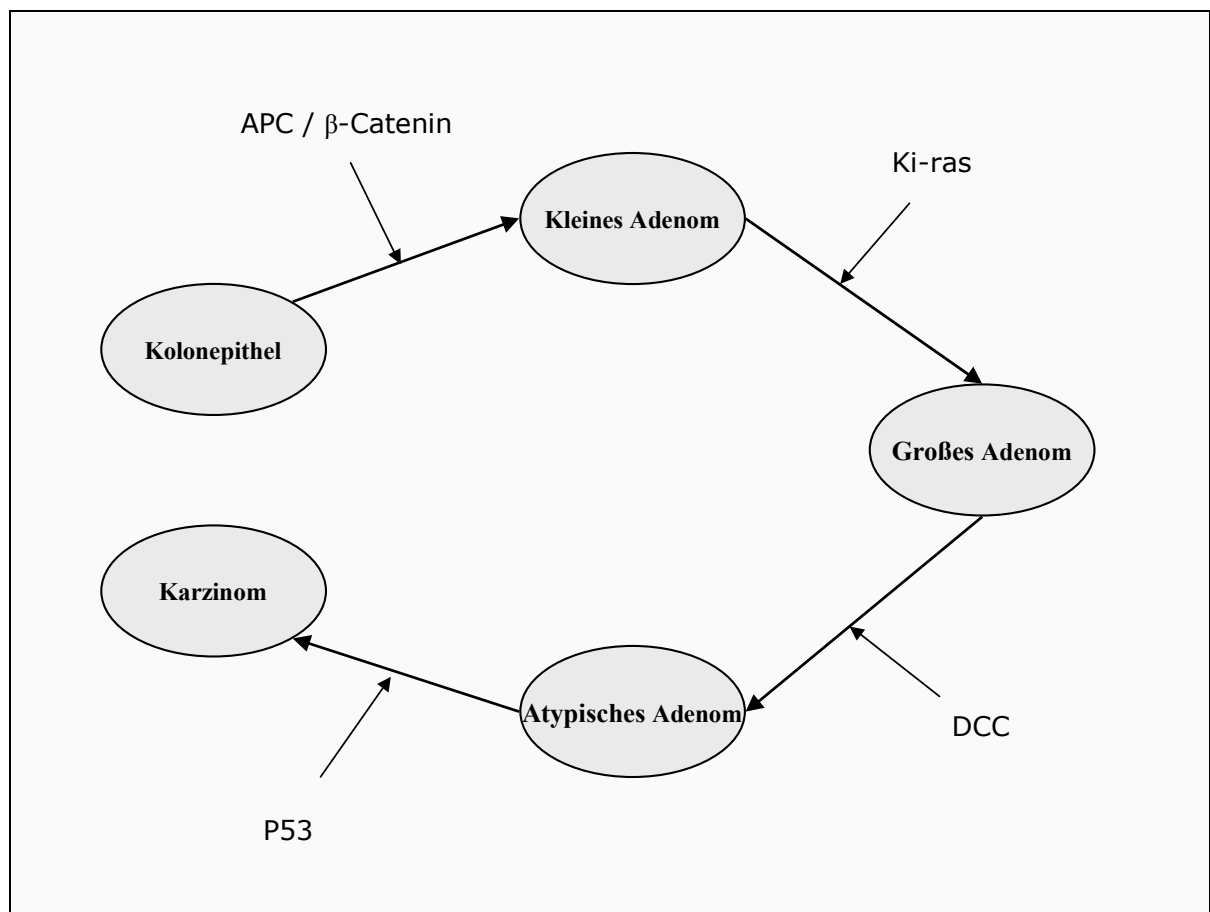


Abbildung 1: Modell der Epithel-Dysplasie-Karzinomsequenz; bei der Karzinogenese ist eine schrittweise Inaktivierung von APC-,  $\beta$ -Catenin-, ki-ras-, DCC- und p53-Genen zu finden, wobei jeder bestimmte Allelverlust einen spezifischen Prozess in der Entstehung zum Malignom bedingt

Molekularbiologisch findet sich in der frühen Phase eine Alleldeletion des APC-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 5q21. Über 70 % aller kolorektalen Karzinome und bis zu 90 % der Adenome weisen eine solche Mutation auf. Es ist für die Entwicklung der dominant vererbten „familiären adenomatösen Polyposis coli“ verantwortlich. Die Interaktion von APC mit dem Onkogen  $\beta$ -Catenin ist von entscheidender Rolle bei der frühen Entwicklung von Adenomen. Bei APC- und/oder  $\beta$ -Catenin-Mutation kommt es zu einer zytoplasmatischen Erhöhung von  $\beta$ -Catenin, da das APC-Protein dieses nicht mehr degradieren kann. Es folgt eine Migration zum Nucleus, so dass  $\beta$ -Catenin über die Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren Tcf/Lef somit eine Induktion weiterer Faktoren wie c-myc und cyclin D zum Tumorprogress beiträgt (22, 82, 96, 97, 111). DNA-Hypermethylierungen, die eine erhöhte Bereitschaft der Chromosomenbrüchigkeit bedingen, und Protoonkogenaktivierung des ki-ras- Gens führen zu einer gesteigerten Proliferation des Darmepithels. Dieser ras-Aktivierung wird eine frühe Rolle im Progress des Kolonkarzinoms zugeschrieben, und ki-ras-Mutationen werden zu 60 % bei Adenomen gefunden. Ein weiterer Allelverlust ist auf dem Chromosom 18q21 beschrieben. Er betrifft das DCC-Gen (deleted in colorectal cancer), dessen Produkt für die Zelladhäsion verantwortlich ist. Der Verlust dieses Proteins verursacht eine Lockerung der interzellulären Bindung und Zell-Matrix-Bindung. Die fortschreitende Entdifferenzierung der hochgradigen Dysplasie geht auf einen Allelverlust des p53-Gens zurück, welches auf dem Chromosom 17p13 lokalisiert ist. Somit ist die Mutation des p53-Gens eine spät eintretende Mutation in der Epithel-Dysplasie-Karzinomsequenz (21, 81). Deletion in Allelen des p53-Tumorsuppressorgens erscheinen häufig bei Karzinomen (75

%), aber nur relativ selten in Adenomen (10 %), weshalb auf eine späte Inaktivierung dieses Gens in der Kolonkarzinogenese geschlossen wurde. Ferner spielen bei der Tumorgenese noch mehrere Faktoren, beispielsweise Mutationen der Onkogene c-erb- und c-myc und des MCC-Onkogens eine Rolle (109). Die Transformation von normaler Epithelzelle zur Metastase ist wohl durch eine Vielzahl von genomischer und zellulärer Veränderungen charakterisiert, Aberrationen von Wachstumsfaktoren, Matrix-degradierenden Enzymen oder Zell-Adhäsionsrezeptoren. Von besonderem Interesse sind jedoch das Tumorsupressorgen p53 sowie das Protoonkogen ki-ras, die in der Adenom-Karzinom-Sequenz die wichtigste Rolle spielen (11, 21, 43). Das komplexe Bild der schrittweisen Inaktivierungen einzelner Proteine variiert je nach Art des Tumors und trifft in der genannten Reihenfolge nicht zwingendermaßen für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten Karzinome zu. So lässt sich p53 bei Colitis ulcerosa-Patienten bereits in der frühen Phase der Karzinogenese, insbesondere in dysplastischen Veränderungen, nachweisen (115).

Neben der Adenom-Karzinom-Sequenz gibt es Mikrosatellitenmarker, einen zweiten, unabhängigen Weg in der Entstehung kolorektaler Karzinome. Durch Mutationen in den Reparaturgenen entstehen bei der Zellteilung nicht mehr korrigierbare Basenfehlpaarungen, die an Stellen repetitiver kurzer DNA-Fragmente auftreten (sogenannte Mikrosatelliten). Trotz individueller Variation der Basenwiederholungen an einem bestimmten Locus ist die Länge der einzelnen Mikrosatellitenmarker in jedem Gewebe eines Individuums gleich. Bei Mikrosatelliteninstabilitäten bestehen Differenzen zwischen Normal- und Tumorgewebe. Mikrosatellitenmarker sind BAT25, BAT26, D5S346, D7S520 und D2S123. Besonderes Interesse bei kolorektalen Karzinomen besteht in bezug auf Mutationen im Gen BAT26, da es ein sensibler Marker für Mikrosatelliteninstabilitäten ist und am häufigsten unter den Mikrosatellitenmarkern nachzuweisen ist (1, 2).

### 1.4.3 p53-Tumorsuppressorgen

Dem p53-Gen, das ein nukleäres Phosphoprotein mit einer molekularen Masse von 53.000 Dalton und 393 Aminosäuren Länge codiert, werden viele Aufgaben in der Regulation des Zellzyklus zugeschrieben. Es greift in Prozesse wie Wachstum, Apoptose, Transformation sowie Differenzierung ein und ist bis heute die am häufigsten nachweisbare genetische Veränderung bei malignen Erkrankungen.

Das p53-Protein wird auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p12-17p13.3) codiert. Durch Mutation, Deletion oder Komplexbildung mit anderen Proteinen kann p53 inaktiviert werden. Dadurch verliert es seine Funktion als negativer Regulator und hat nun die Möglichkeit, mit Onkoproteinen aus der Reihe der ras, myc oder E1A zu interagieren (108). In der Regel handelt es sich um „missense“ Mutationen, welche zum Austausch einer Aminosäure im p53 Protein führen. Auf diesem Weg wird die Konformation verändert und die Stabilität des p53-Proteins beeinträchtigt. Indirekt können die Mutationen die Sequenz-spezifische DNA-Bindung und Transkriptionsfaktoraktivität beeinträchtigen (108). Verglichen mit dem Wildtyp hat die mutierte Form eine wesentlich verlängerte Halbwertszeit (etwa 24 Stunden versus 20 Minuten), so dass es in den meisten malignen Tumoren und Tumorzelllinien in hoher Konzentration vorliegt. Des Weiteren führt der Verlust des Wildtyp-Allels des p53-Gens zu einer fehlenden Verzögerung des Zellzyklus in der G1 Phase, in der die Schäden der DNA repariert werden können. Dieser beschleunigte Zellzyklus kann zu einer verfrühten DNA-Synthese in der S Phase führen, so dass eine verminderte Reparaturzeit eine erhöhte Frequenz an Mutationen bedingen kann. Im Gegensatz zu Onkogenen werden Tumorsuppressorgene bei vielen Karzinomen erst dann aktiviert, wenn Mutationen oder Deletionen in beiden allelen Genen vorliegen (loss of heterozygosity). Verschiedene Studien haben auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p), der Lokalisation vom p53-Gen, diesen Verlust der Heterozygotie zu 60–70 % von

menschlichen kolorektalen Karzinomen nachweisen können (11, 48, 108). In einigen Fällen reicht jedoch auch der alleinige Verlust eines Allels aus, um eine maligne Transformation zu bewirken.

Bei dem Li-Fraumeni-Syndrom, einer seltenen Erbkrankheit mit hohem Risiko für Sarkome von Knochen und Weichgewebe, Brust- und anderen Tumoren, ist eine erbliche Form von p53-Mutationen beschrieben. Sowohl „missense“ als auch „nonsense“ Mutationen wurden im Erbgut der Betroffenen gefunden. In der Regel haben Patienten dieses Syndroms ein p53-Wildtyp- und ein mutiertes Allel. Es können unter Umständen Jahre bis zum Ausbruch vergehen, obwohl eine Mutation seit Geburt vorliegt.

Sporadische Mutationen in p53 sind bei Präkanzerosen des Kolons (kolorektale Adenome und langjährige chronisch entzündlichen Darmerkrankungen) (43, 45), vor allem jedoch bei manifesten kolorektalen Karzinomen (70%), kleinzelligen Bronchialkarzinomen (70%), im anaplastischen Schilddrüsenkarzinom (68%) und Mammakarzinom (40%) nachweisbar. Die häufigsten Aberrationen betreffen die hydrophobe Mittelregion des p53-Proteins, insbesondere die Kodons 175, 245, 248, 249, 273 und 282. Diese sogenannten „hot spots“ befinden sich in den Exons III bis V. Die unterschiedlichen p53-Mutantenallele differieren in ihrer Eigenschaft, so dass einige Zellen bis zum 10-fachen besser transformieren können (40).

Das p53-Protein scheint mit anderen Tumorsuppressorgenen sowie Onkogenen zu interagieren. Shomori et al. untersuchten die Expression der Thymidinphosphorylase in menschlicher kolorektaler Mucosa, Adenomen und Karzinomen und den Zusammenhang dieses Enzyms mit der p53-Expression (88). Die Thymidinphosphorylase ist identisch mit dem „platelet-derived endothelial cell growth factor“ (PD-EDGF), der als ein potenter Faktor in der Angiogenese wirkt und an der tumoralen Mikrovaskularisation beteiligt ist. Die Frequenz der Thymidinphosphorylase-Expression war in den p53-negativen Karzinomen signifikant niedriger als in den positiven, so dass Shomori darauf schloss, dass

p53 ein wichtiger Faktor in der Expression der Thymidinphosphorylase ist, aber nicht den alleinigen Einfluss auf die Bildung des Enzyms haben kann und andere Faktoren mit beteiligt sind.

Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens können unter anderem durch die verlängerte Halbwertszeit zu einer Akkumulation des Genproduktes in der Zelle führen. Dieses induziert über unbekannte Mechanismen eine humorale Immunantwort gegen das p53-Protein mit Antikörpern zumeist der IgG-Klasse. Diese Antikörper wurden bei Risikopatienten, beispielsweise chronisch entzündliche Erkrankungen, und Karzinompatienten, gefunden (6, 32, 39, 67, 73, 90, ). Fricke et al. untersuchte Serumantikörper gegen p53 bei 76 Patienten mit Morbus Crohn, 61 Patienten mit Colitis ulcerosa und 206 Verwandten ersten Grades von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten (32). Bei drei Patienten mit Colitis ulcerosa und bei zwei Patienten mit Morbus Crohn konnten p53-Antikörper im Serum nachgewiesen werden, nicht jedoch bei Verwandten ersten Grades betroffener Patienten. Makroskopisch und in den Stufenbiopsien mikroskopisch bestand kein Hinweis auf eine Dysplasie oder auf ein malignitätsverdächtiges Areal. Lubin et al. zeigten, dass Serumantikörper gegen p53 bei Risikopatienten für Bronchialkarzinom (starke Raucher) vor einer solchen klinischen Diagnose detektiert werden konnten und schloss darauf, dass die Antikörper als ein früher Marker für das Bronchialkarzinom dienen könnten (58). Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom waren Autoantikörper gegen p53 in 26 % zu finden und der Titer stieg parallel zum Tumorprogress an (39). Möglicherweise stellt der Prozess ein recht frühes Ereignis in der Tumorgenese dar und kann unter Umständen noch vor klinischer Manifestation eines Karzinoms detektiert werden.

#### 1.4.4 ki-ras Onkogen

Das Proto-Onkogen der ras Familie wurde initial in humanen Harnblasenkarzinomzellen untersucht und ist ein entscheidender Regulator von Zellwachstum. Tumoren des Pankreas weisen die größte Assoziation mit mutiertem ki-ras-Gen auf und haben beständig den gleichen Lokus der Abweichung im Kodon 12 (57). In bis zu 15 % aller menschlichen Karzinome sind Mutationen in den ras-Genen (H-ras, K-ras, N-ras) nachweisbar. Insbesondere bei Bronchial- und Kolonkarzinomen wurde das Spektrum der Mutationen untersucht (50, 52). Ras-Mutationen werden in prämaligen Geweben von Kolon oder Schilddrüse entdeckt. In anderen Tumorarten, etwa der chronisch myeloischen Leukämie, erscheinen Mutationen des ras-Gens im fortgeschrittenen Stadium der Entwicklung.

Das ki-ras Protoonkogen ist 5775 Basenpaare (bp) lang. Es hat vier Exons, die für das 188 bzw. 189 Aminosäuren große Protein p21 mit GTPase-Aktivität kodieren. Da es eine Variable im Exon 4 gibt, bestehen zwei Varianten des sehr ähnlichen Proteins. Die am häufigsten identifizierten Mutationen liegen in Kodon 12 und 13 des ersten Exons.

Eine verstärkte Expression von ki-ras in kolorektalen Neoplasien im Vergleich zu normaler Mucosa wurde in mehreren Studien beschrieben (30, 33, 61). Michelassi et al. konnte eine erhöhte Expression des ki-ras-Produktes p21 im Stadium Dukes C von kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu Dukes B nachweisen (61), was auf eine spätere Beteiligung bei der Tumorgenese hinweist.



## 2 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Anhand von Risikopatienten zur Entwicklung kolorektaler Karzinome sollten im Rahmen dieser Arbeit genetische Veränderungen in der Kolonlavage, der bei der Koloskopie anfallenden Spüllösung untersucht werden. Bei Patienten mit langjährigen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnten in Voruntersuchungen Mutationen des p53- und ki-ras-Gens nachgewiesen werden (53, 54).

Ziel der vorliegenden Arbeit bezüglich kolorektaler Adenome war es,

- Mutationen des p53- und ki-ras-Gens zu untersuchen und
- den Zusammenhang zwischen Mutationsnachweis und Dysplasiegrad zu analysieren und
- schließlich auch den Mutationsnachweis mit der Anzahl der Polypen zu korrelieren.

Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sollte untersucht werden:

- Abhängigkeit des Mutationsnachweises von der kumulativen Krankheitsdauer sowie der Ausdehnung des intestinalen Befalls
- Bestätigung des p53-Mutationsnachweises mittels Sequenzierung
- Nachweis der p53-Autoantikörper im Serum im Vergleich mit der Ausdehnung im Kolorektum sowie mit dem Dysplasiegrad von entnommenen Gewebeprobe.

### 3 Methodik

#### 3.1 Patienten

Untersucht wurden 212 Patienten: 45 Patienten wiesen Adenome des Kolorektums auf, 129 Patienten waren an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung erkrankt. Die Kontrollgruppe umfasste 38 Patienten (siehe folgende Tabelle).

	<b>Anzahl</b>	<b>Alter</b>	<b>Frauen / Männer</b>
<b>Adenome</b>	45	69	18 / 27
<b>CED</b>	129	43	75 / 54
<b>Kontrolle</b>	38	49	18 / 20

Tabelle 1: Anzahl, mittleres Alter und Geschlecht der untersuchten Populationen

Von den Patienten mit Morbus Crohn war bei 18 Patienten, vor Entnahme der Spüllösung, eine Ileozökalresektion beziehungsweise eine Hemicolectomie notwendig.

Bei dem Kollektiv für die Untersuchung von Adenomen waren infektiöse Erkrankungen, sowie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ausgeschlossen

In der Kontrollgruppe lagen keine Neoplasien, Adenome sowie infektiösen Darmerkrankungen vor. Der klinische Befund war unauffällig.

Zur Darmreinigung nahmen die untersuchten Patienten einen Tag vor der Untersuchung das Laxans X-Prep® und zwei bis vier Stunden vor der Endoskopie zwei bis drei Liter Polyethylen-Glycol-haltige Lösung ein.

Im Rahmen eines aufklärenden und anamnestischen Gesprächs mit Erhebungen über Dauer, Rezidivhäufigkeit, bisherige Therapien mit eventuellen Operationen, extraintestinalen Manifestationen, Familienanamnese, Nikotinkonsum und gegenwärtige Symptome der Erkrankung wurde von den in die Studie aufgenommenen Patienten die schriftliche Einverständnis eingeholt.

### **3.2 Probengewinnung**

Zur Analyse der DNA wurde Darmflüssigkeit (Lavage) verwendet, die während Routinekoloskopien abgesaugt und gesammelt wird.

Zur Koloskopie wurde ein gereinigtes und von Chemikalien befreites Endoskop genommen, damit mögliche Lysen von Zellen beziehungsweise die Degradation der DNA oder die weiteren aufbereitenden Schritte beeinträchtigende oder verfälschende Faktoren reduziert werden. Verwendet wurden die Endoskope CF 230I sowie CF 1T20L (Olympus, Hamburg). Die Reinigung der Endoskope erfolgte mit einem vollautomatischen

Endoskop-Reinigungs- und Desinfektionsgerät, Endo-Thermo-Disinfector ETD 2 Plus (Olympus, Hamburg), sowie einem gereinigten Auffangbehälter (Olympus, Hamburg).

Die gewonnene Lavage wurde in fest verschließbare, gereinigte Gefäße gegeben und stand so für anstehenden Untersuchungen bereit.

Für die p53-Autoantikörper wurde von den Patienten 7,5 ml venöses Blut gewonnen und im Anschluss wurden die Seren im Labor aufgearbeitet.

Die Proben und Daten wurden unverzüglich nach deren Erhalt anonymisiert.

### **3.3 Aufbereitung und DNA-Extraktion**

Das von der Blutentnahme gewonnene Serum wurde zentrifugiert und vorsichtig abpipettiert, ohne den „Buffy-coat“, die mittlere Phase aus Leukozyten, aufzuwühlen.

Die bei der Koloskopie gewonnene Lavage wurde unmittelbar mit PBS-Puffer (8 g NaCl/ 0,2 g KCl/ 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 1000 ml aqua destillata, pH 7,3-7,4) mehrmals gewaschen und bei 53.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Durch das mehrmalige Durchführen dieses Vorganges konnte der Reinheitsgrad der DNA erhöht werden. Anschließend wurden die Proben in geeignete Eppendorfgefäße pipettiert, nummeriert und beschriftet.

Die Lavage und die Seren zur Untersuchung auf p53-Autoantikörper wurden bis zur Durchführung der Analysen bei -20°C gelagert.

Die darauf folgende Extraktion und Reinigung von Nukleinsäure erfordert die Lyse der Zellmembran, Inaktivierung der Nuklease und Trennung der gewünschten DNA von den übrigen zellulären Bestandteilen. Dieser Vorgang geschah mit dem kommerziell erhältlichen 'DNA/RNA isolation kit' der Firma Amersham (Cleveland, Ohio, USA). Es werden die Eigenschaften von Guanidin-Thiocyanat ausgenutzt, womit die zelluläre Integrität und DNase- und RNase-Aktivität inhibiert werden. Das Guanidin-Thiocyanat-Lysat wird mit einer Reagenz, die eine nuclease-bindende Matrix enthält, inkubiert. So können die wässrige und die organische Phase durch Zentrifugation voneinander getrennt werden. Aus der extrahierten DNA wurden Aliquote hergestellt und in entsprechend beschrifteten 5 ml Eppendorfgefäßen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.4 DNA-Amplifikation**

Das ki-Ras Gen hat vier Exons, die für das 188 bzw. 189 Aminosäuren große, 21 Kilodalton schwere Protein p-21 kodieren. Im vierten Exon besteht eine Normvariante, weshalb zwei sich stark ähnelnden Proteine existieren können.

Die am häufigsten bestehenden Mutationen dieses Gens betreffen Kodon 12 und 13 des ersten Exon. Mit den Primern PA 11 und PA 12 wurde ein Amplifikat, das Kodon 12 und 13 enthält, mit 109 Basenpaaren Länge hergestellt.

<b>PA 11</b>	<b>5'-GAC TGA ATA TAA ACT TGT GG</b>	<b>Exon 1</b>
<b>PA 12</b>	<b>3'-CTC TAT TGT TGG ATC ATA TT</b>	<b>Exon 1</b>

Tabelle 2: Primer PA 11- und PA 12-Sequenz, nach der die „hot - spot“ Region im Exon 1, Kodon 12 und 13 des ki-ras-Gens amplifiziert wurde

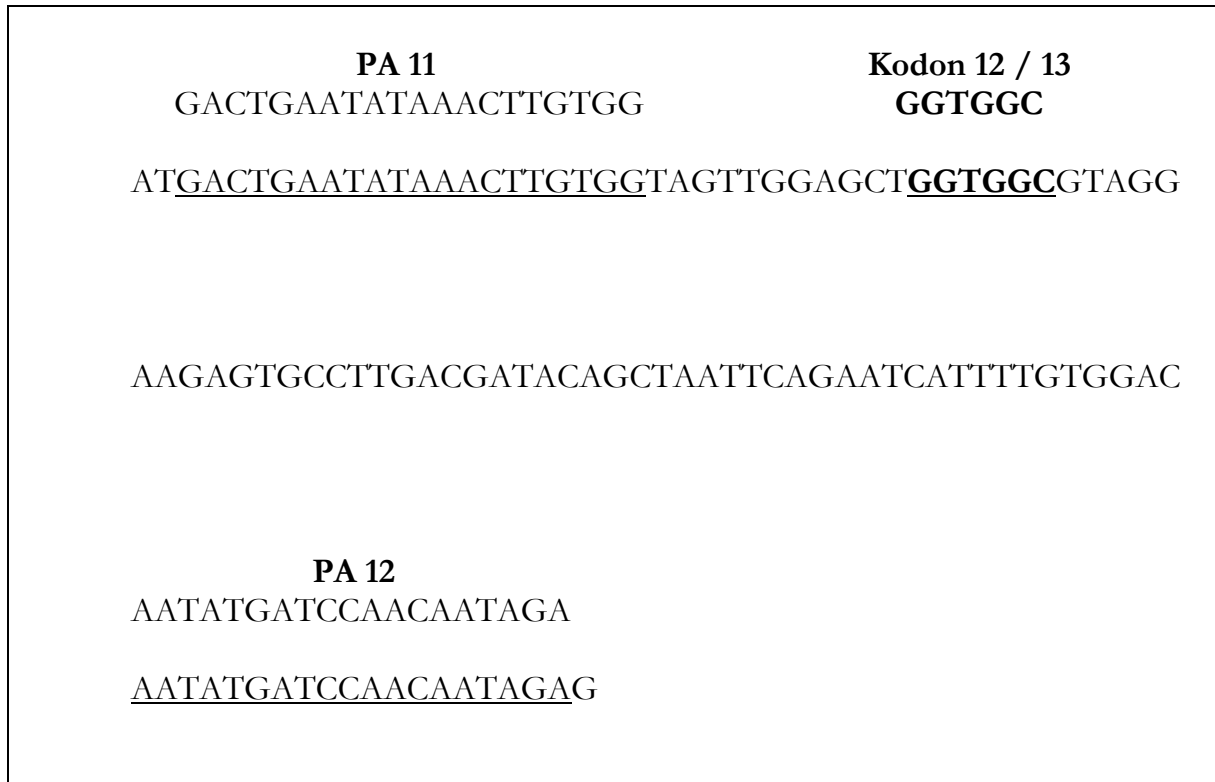


Abbildung 2: Ki-ras; mit den Primern PA 11 und PA 12 wird eine Sequenz, welche Kodon 12 und 13 enthält, amplifiziert. Dargestellt ist das Exon 1; dünn unterstrichen = Primer PA 11 bzw. 12; dick unterstrichen = Kodon 12 und 13

Zur Analyse von p53 wurden nur die Fragmente amplifiziert, bei denen Mutationen am häufigsten beschrieben werden. Es handelt sich hier vornehmlich um die Exon 5 bis 8. Mit den Primern C1 und C2 wurde Exon 5, mit C3 und C4 Exon 6, mit DR und DL Exon 7 und mit E1 sowie E2 Exon 8 amplifiziert.

Die Sequenz der Primern ist der Literatur entnommen (53).

C1:	5'- <b>TTC CTC TTC CTG CAG TAC TC</b>	Exon 5
C2:	5'- <b>ACC CTG GGC ACC AGC CCT GT</b>	Exon 5
C3:	5'- <b>ACC ATG AGC GCT GCT CAG AT</b>	Exon 6
C4:	5'- <b>AGT TGC AAA CCA GAC CTC AG</b>	Exon 6
DR:	5'- <b>GTG TTA TCT CCT AGG TTG GC</b>	Exon 7
DL:	5'- <b>CAA GTG GCT CCT GAC CTG GA</b>	Exon 7
E1:	5'- <b>CCT ATC CTG AGT AGT GGT AA</b>	Exon 8
E2:	5'- <b>CCA AGA CTT AGT ACC TGA AG</b>	Exon 8

Tabelle 3: Primer für p53-Amplifikation

Die PCR wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Ca. 500 ng genomische DNA wurde einem Reaktionsgemisch, bestehend wie folgt, zugesetzt:

- dNTP-Mix der Firma Sigma® (zu gleichen Teilen dATP, dCTP, dGTP und TTP enthaltend) in einer Konzentration von 160  $\mu\text{M}$ ;
- PCR-Reaktionspuffer aus 100 mM Tris-HCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500 mM KCl, pH 8,3;
- 2,5 Units Taq-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*;
- jeweils 4  $\mu\text{l}$  Primer in einer Konzentration von 50 pM /  $\mu\text{l}$ .



Um eine Evaporation zu unterbinden, wurden etwa 50 – 60 µl eines leichten Mineralöls zum Schluss auf das Reaktionsgemisch gegeben.

Die PCR wurde in einem vollautomatischen Thermocycler (Firma Biometra) durchgeführt. Am Anfang wurde die Matrizen-DNA auf 95°C für 5 Minuten erhitzt, um die komplexe genomische DNA vollständig zu denaturieren, so dass sich die Primer nach Abkühlung an die genomische, komplementäre Sequenz anlagern können (annealing). Dieser Schritt des „Annealings“ wurde für 1 Minute bei 52 °C durchgeführt. Die Extension, also Verlängerung der Primer (Polymerisation), erfolgte für 1,5 Minuten bei 72 °C. Die Schritte der Denaturierung über Annealing zur Polymerisation wurden in 27 Zyklen wiederholt, wobei die Zeit der Denaturierung auf 1 Minute sank (siehe Tabelle 3). In der letzten Runde der Zyklen wurde die Zeit für die Polymerisation auf 10 Minuten verlängert, um alle Stränge vollständig zu synthetisieren.

Denaturierung	95 °C	60 Sekunden	27 Zyklen
Annealing	52 °C	90 Sekunden	
Polymerisation	72 °C	60 Sekunden	

Tabelle 4: PCR-Protokoll

### 3.5 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Kontrolle der vorherigen Amplifikation von DNA wurde das entstandene Reaktionsprodukt auf ein Agarosegel aufgetragen.

Es wurden 1,6 g Pulver Agarose (Firma Sigma) abgewogen und in 80 ml verdünnten TAE-Puffer unter leichtem Rühren aufgelöst. Man erhält so ein Gel mit einer Konzentration von 2 % Agarose, deren optimaler Trennbereich zwischen 100 und 3000 bp liegt. Der Trennbereich verringert sich mit der Agarosekonzentration. Dann wurde die Lösung unter fortwährenden Rühren aufgeköcht. Nach 2 - 3 Minuten Abkühlung wurde der Lösung unter einem Abzug 3 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Es handelt sich hierbei um einen fluoreszierenden Farbstoff, der in die DNA interkaliert. Die Nachweisgrenze liegt bei unter einem Nanogramm DNA pro Bande. Nach einer Abkühlungszeit wurde auf das verfestigte Gel 25 µl PCR-Produkt, welches zuvor mit 5 µl Farbstoff (Gel Loading Solution) vermengt wurde, aufgetragen. Mit einer 123 bp großen Leiter können die gewünschten Banden zugeordnet werden. Die Elektrophorese lief bei 100 Volt (konstant) für etwa 30 Minuten. Die Laufweite der DNA kann mit Hilfe der Gel Loading Solution abgelesen werden.

Mit Hilfe einer UV-Lampe kann die DNA durch das an ihr gebundene Ethidiumbromid zur Darstellung gebracht und analysiert werden.

Das Protokoll der Agarosegel-Elektrophorese ist der Literatur (53, 54) sowie der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München) entnommen.

### 3.6 Mutationsanalyse

#### 3.6.1 Hybridisierung von Dot-blots

Im *ki-ras*-Gen wurden die Mutationen mittels Hybridisierungen von Dot-blots mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden festgestellt (45). Für den Nachweis bekannter Punktmutationen wird jeweils ein spezifisches Oligonukleotid für eine bestimmte Mutation benötigt, so dass die Suche auf bestimmte Kodons, den „hot-spots“ Kodon 12 und 13, Exon 1, des entsprechenden Gens, beschränkt bleibt. Diese Dot-blot-Analyse wurde in Anlehnung an ein modifiziertes Protokoll von Verlaan-de Vries et al. durchgeführt (106).

Die PCR-Produkte wurden auf eine Nylon-Trägermembran aufgetragen und bei 120 °C für 30 Minuten immobilisiert.

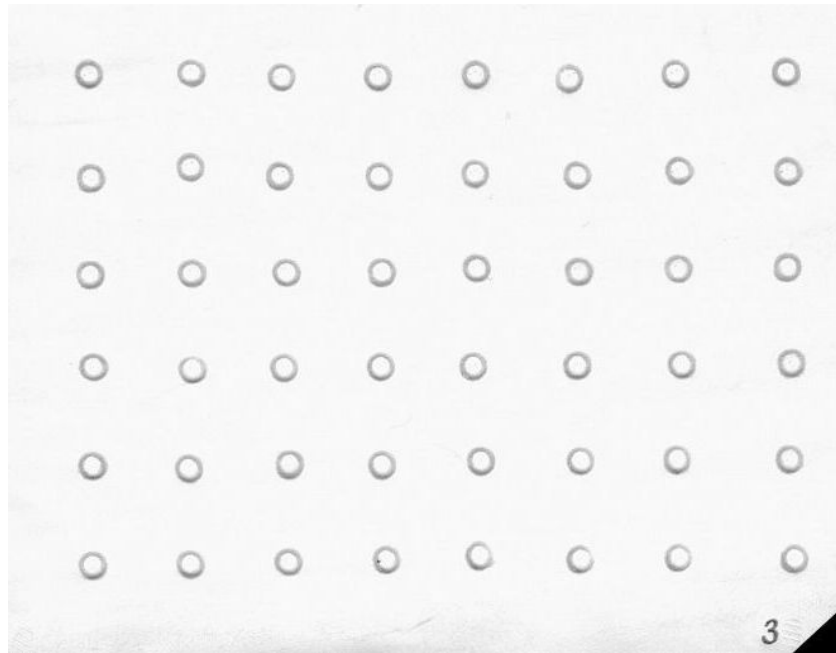


Abbildung 3: Nylon-Membran, auf deren „dots“ die DNA „geblottet“ wird

Danach wurde der Filter bei 65 °C für weitere 30 Minuten in einer Prähybridisierungslösung (7,5 ml 20 x SSC, 300 µl N-Laurylsäure, 30 µl 20 % SDS, 3 ml 10 x Blocking reagent - Firma Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland - bestehend aus 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5 mit NaOH eingestellt – auf 30 ml Gesamtvolumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt) gewaschen. Nach einer 5 minütigen Kühlung auf Eis folgte für eine Stunde die Prähybridisierung bei 53 °C. Es sollen so unspezifische DNA-Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden um eine Reduzierung des Hintergrundes zu bewirken. Nach erneuter Schockkühlung in Eis wurden die geblotteten Membranen bei 53 °C für 18 Stunden mit DNA-Sonden (siehe Tabelle 4), die ca. 250 ng Oligonucleotide enthalten, hybridisiert.

Oligonucleotid – 1	GGT GGC	Glycin	Kodon 12
Oligonucleotid – 2	GCT GGC	Alanin	Kodon 12
Oligonucleotid – 3	GAT GGC	Asparaginsäure	Kodon 12
Oligonucleotid – 4	GTT GGC	Valin	Kodon 12
Oligonucleotid – 5	CGT GGC	Arginin	Kodon 12
Oligonucleotid – 6	AGT GGC	Serin	Kodon 12
Oligonucleotid – 7	TGT GGC	Zystein	Kodon 12
Oligonucleotid - 8	GGT GAC	Asparaginsäure	Kodon 13

Tabelle 5: Dargestellt sind die entsprechenden Oligonucleotidsequenzen von Kodon 12 und 13; Oligonucleotid 1 entspricht dem Wildtyp, 2–8 entsprechen den verschiedenen möglichen Mutationen an Kodon 12 beziehungsweise 13 sowie den kodierenden Aminosäuren

Nachfolgende diverse Waschschrte mit SSC-Puffer (Natriumchlorid/ Natriumcitrat; 3M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat) und SDS (Natrium dodecyl sulfat, 10%) sowie Maleinsäurelösung (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5) sollten ungebundene DNA-

Sonden entfernen. Für 60 Minuten wurde die Membran unter Schwenken in einer Lösung aus Blocking reagent und Maleinsäure geblockt. Fab Fragmente von Schafen mit Antidigoxigenin–Antikörper, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind (Firma Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland), wurden mit der Nylonmembran für 30 Minuten inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurde der Filter mit einem chemilumineszenten Substrat für die alkalische Phosphatase, CSPD® (Firma Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland), inkubiert. Wird die Membran für 10 Minuten bei 37 °C weiter bebrütet, wird eine „Steady State Phase“ erreicht und mittels der Lumineszenz können positive Signale auf einem Röntgenfilm durch die Intensität der Schwärzung detektiert werden.

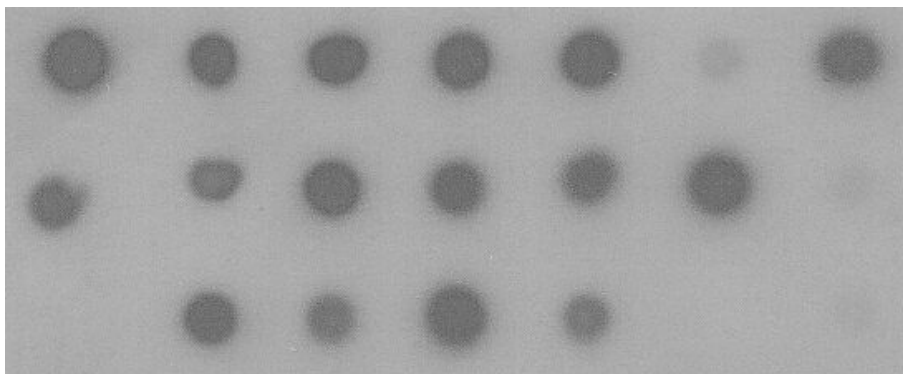


Abbildung 4: Positive Signale bei Oligonucleotid–7 (Wildtyp) bei der Hybridisierung. Auf einem Röntgenfilm mittels antidigoxigenin-markierten Antikörpern sichtbar gemachte Signale

Die Proben wurden zu Anfang mit dem den Wildtyp detektierenden Oligonucleotid–1 untersucht. Eine Schwärzung auf dem Film bedeutet, dass DNA vorhanden ist, da der Wildtyp eine Sequenz untersucht, die stets, also auch in Proben, bei denen Mutationen

nachgewiesen werden, nachweisbar ist. Grund hierbei ist, dass in der Lavage auch bei Nachweis von Mutationen stets ein Anteil nicht mutierter Zellen vorliegt. Es handelt sich um leukozytäre DNA oder unveränderte epitheliale oder mesenchymale Zellen.

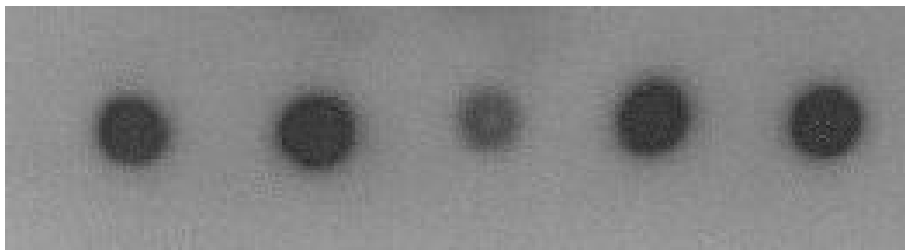


Abbildung 5: Positive Signale bei Oligonukleotid 1, mit dem der Wildtyp detektiert wird

Dies bedeutet, dass ein fehlendes Signal eine erneute Amplifikation erforderlich macht. Gründe hierfür können in der Lavage an sich, der Extraktion, der Amplifikation oder der Hybridisierung liegen. Entweder enthält die Lavage keine DNA, die Probe ist durch negativ beeinflussende Faktoren zerstört worden oder es liegen Fehler in den einzelnen Untersuchungsschritten vor. Diese Fälle erfordern dann eine erneute DNA-Amplifikation, wenn dieselben Proben bei anderen Oligonukleotiden positive sind, beziehungsweise eine erneute Extraktion mit anschließender PCR, wenn letzteres nicht der Fall ist. Jede runde Schwärzung an Position der aufgetragenen DNA wurde als positiv gewertet. Waren nur sehr schwache Schwärzungen zu erkennen, wurden diese Untersuchungen wiederholt durchgeführt und im Zweifel negativ gewertet. Ebenso wurden die Untersuchungen bei einem zu kräftigen Hintergrund wiederholt und die Proben mit der Intensität beim Wildtyp verglichen. Auf der Abbildung 6 ist ein positives Ergebnis zu erkennen. Links von der positiven Proben sind vier weitere aufgetragen worden, die jedoch aufgrund von mutierter DNA kein entsprechendes Oligonucleotid gebunden haben und somit kein

fluoreszierendes Signal erzeugen. Es handelt sich um eine Mutation im Kodon 12 die zur Folge hat, dass die Aminosäure Glycin durch das Abwandeln einer einzigen Base in der genomischen DNA-Sequenz des betreffenden Gens in Zystein umgewandelt wird (siehe Tabelle 5).



Abbildung 6: Ein deutliches Signal auf dem Röntgenfilm einer mit Oligonucleotid-7 hybridisierten Probe; es liegt eine Mutation vor, bei der die Aminosäure Glycin durch Zystein in Kodon 12 ersetzt wurde



<p>ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA GCT <b>GGT</b>  GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG CTA ATT  CAG AAT CAT TTT GTG GAC GAA TAT GAT CCA ACA ATA GAG</p>	<p>Kodon  12 -  Glycin</p>
<p>ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA GCT <b>TGT</b>GGC  GTA GGC AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG CTA ATT CAG AAT  CAT TTT GTG GAC GAA TAT GAT CCA ACA ATA GAG</p>	<p>Kodon  12 -  Zystein</p>

Tabelle 6: Exon 1-Sequenz von ki-ras: oben als Wildtyp und Markierung von Kodon 12 (vergrößerte und fette Schrift), unten der Basenaustausch von Guanin zu Thymin, was den Ersatz von Glycin zu Zystein zu Folge hat

Wenn sich ein positives Ergebnis finden lässt, es also eine Mutation im Gen vorliegt, so werden die Untersuchungen ein weiteres Mal zur Kontrolle und zur Prüfung der Reproduzierbarkeit durchgeführt. Nur bei zwei positiven Ergebnissen wird die Mutation als positiv gewertet.

Als Positivkontrollen dienen Biopsate von kolorektalen Karzinomen mit gesicherten Mutationen, als Negativkontrollen leukozytäre DNA gesunder Probanden.

### 3.6.2 SSCP-Analyse

Doppelsträngige DNA kann bei hoher Temperatur denaturiert werden und in anschließender Schockkühlung in Eis als Einzelstrang erhalten bleiben. Durch Bindungen an sich selbst geht der Einzelstrang eine charakteristische Tertiärstruktur ein, kann jedoch auch mehrere Tertiärstrukturen (Konformere) bilden, so dass diverse Banden in einer Elektrophorese entstehen.

Die Tatsache, dass einzelne Punktmutationen ausreichen, um die Tertiärstruktur des Einzelstrangs zu verändern und konsekutiv eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit zum Wildtyp im elektrischen Feld zur Folge hat, wird für die Detektion einzelner Punktmutationen im p53-Gen genutzt. Es werden die „Single Strand Conformation Polymorphism“, die Einzelstrang-Konformationspolymorphismen, ausgenutzt und gewertet (54, 66, 70, 99). Die Abweichungen des Bandenmusters von nicht mutierter DNA (Abbildung 7) werden mit Aberrationen des Musters verglichen und bewertet (Abbildung 8).

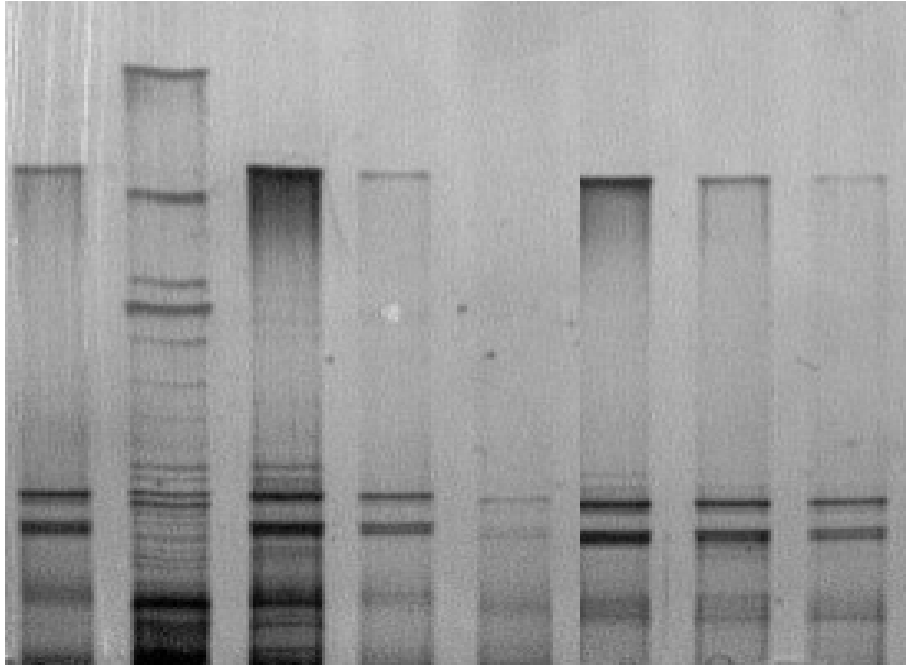


Abbildung 7: Mit Silbernitrat gefärbte Banden einer Vertikalelektrophorese (SSCP); an zweiter Position von links ist eine 123 bp Leiter aufgetragen; alle anderen Proben sind Wildtyp-DNA, deren Banden unterschiedlich stark gefärbt sind, aufgrund der enthaltenen Menge an DNA. An der dritten Bande von links sind über der zu untersuchenden Region Banden zu sehen, die durch verunreinigende Proteine verursacht sind.

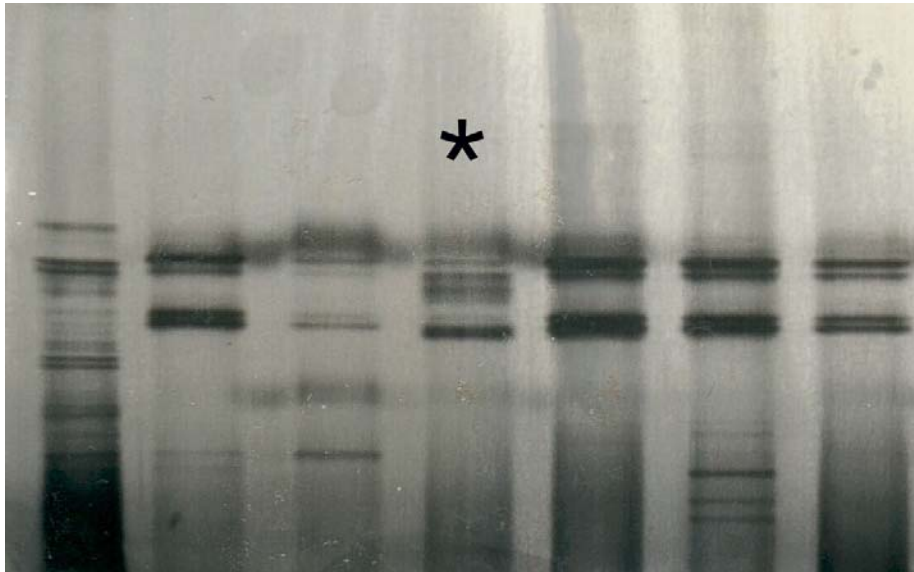


Abbildung 8: Eine mittels Vertikalelektrophorese dargestellte SSCP-Analyse; an der vierten Position von links, beziehungsweise an dem markierten (\*) Lauf sind zusätzliche Banden in dem zu untersuchenden Bereich als Ausdruck eines Konformationspolymorphismus dargestellt. Es handelt sich um Proben, die mit den Primern C3 / C4 amplifiziert wurden, so dass eine Mutation in Exon 6 vorliegt. An erster Position von links ist eine 123 bp Leiter aufgetragen

Für die p53-Mutationsanalyse von Exon 5 bis 8 müssen vier Elektrophoresen durchgeführt werden. Es wurde jedes Exon für sich mit zwei Primern untersucht. Exon 5 besteht aus 183, Exon 6 aus 113, Exon 7 aus 110 und Exon 8 aus 136 Basenpaaren. Die Referenz Wildtyp-DNA wird aus Leukozyten gesunder Probanden extrahiert, amplifiziert und mit auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proben laufen je nach Primer, beziehungsweise Länge der Sequenzen verschieden weit.

Für die SSCP-Analyse mittels Vertikalelektrophorese wurde ein 13 %iges Polyacrylamidgel aus TBE-Puffer, Glycerol und destilliertem Wasser hergestellt. Die Proben wurden zur Spaltung der Doppelstränge mit Hilfe einer Denaturierungslösung (Formamid, Na<sub>2</sub>-EDTA-Lösung, Bromphenolblau) für 7 Minuten bei 96 °C erhitzt und im Anschluss auf Eis schockgekühlt. Die Pufferlösung der Kammer bestand aus einem 1 : 5 TBE-Puffer / aqua destillata Gemisch. Für 3–4 Stunden wurde eine Leistung von 180 Watt eingestellt. Es folgte ein Fixierbad aus Ethanol, Essigsäure und destilliertem Wasser und ein Färbebad für 20 Minuten mit einer 0,1 %igen Silbernitratlösung. Durch eine Lösung aus Natronlauge, Natriumborhydrid, Formaldehyd und aqua destillata wurden die Banden entwickelt und zur Darstellung gebracht. Ein Bad aus 5 %iger Essigsäure stoppt den weiteren Entwicklungsprozess, so dass die Banden klar von einander abzugrenzen sind. Die Gele wurden photographiert und asserviert.

Als Positivkontrolle diente DNA aus Kulturen der HaCat-Zell-Reihe mit bekannten Mutationen in Exon 5 und 8 (Kodon 179 und Kodon 281). Durch Verdünnungsreihen konnte gezeigt werden, dass eine mutierte Zelle von 1 : 10 im Wildtypklon mittels der SSCP-Analyse nachzuweisen war (99). Es wird eine 123 bp lange Leiter zum Ablesen der Bandenlänge mit auf das Gel aufgetragen. Wildtyp-DNA von Leukozyten gesunder Probanden diente auch hier als Negativkontrolle.

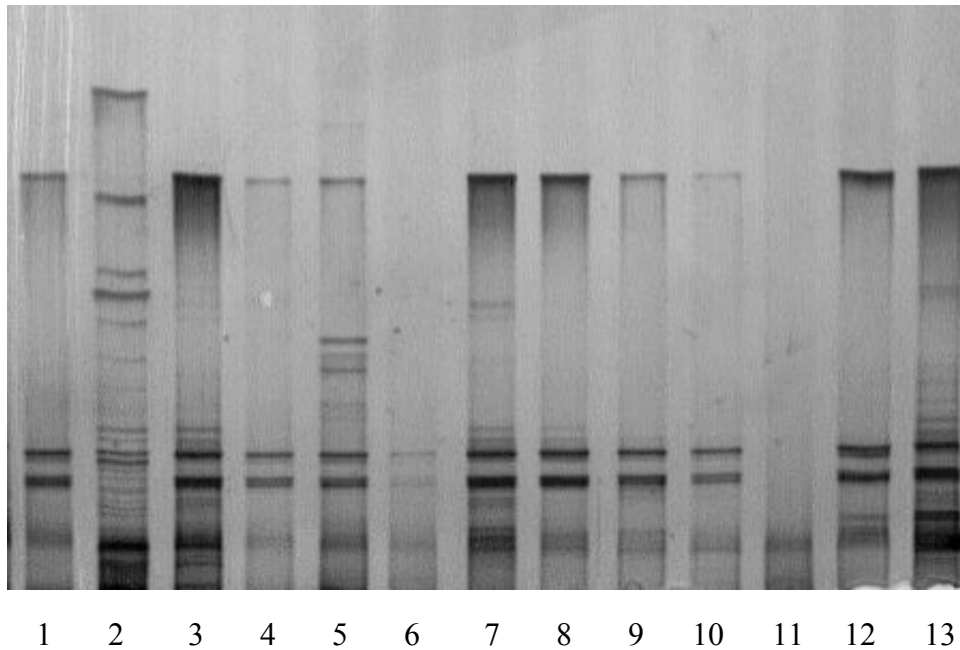


Abbildung 9: Eine SSCP–Polyacrylamidgel–Elektrophorese mit 13 verschiedenen Proben, die zweite Bande von links ist eine 123 bp Leiter, Banden 6 und 11 von links sind schwach ausgeprägt. Banden 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12 und 13 weisen DNA nach; es handelt sich um Wildtyp-DNA

### 3.7 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach Anleitung des Herstellers der nicht-radioaktiven Sequenzierungsmethode durchgeführt. Es wurde ein DNA-Polymerase Sequenzierungs-kit (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, PE Applied Biosystems)

verwendet, der mit Farbstoff markierte Didesoxynucleotide, Taq-Polymerase und Reaktionspuffer enthält. In der Sequenzierungsreaktion wurden 2-5 µl Templet (von der vorherigen Exon-Amplifikation) mit 0,5-1 µl BigDye Terminator Mix gemischt und in einem Thermocycler (Model 2700, Perkin Elmer) amplifiziert.

Die benutzten Primer in "sense" und "reverse" Sequenzierungsreaktion für p53 waren identisch mit denen der p53-Amplifikation, Tabelle 3 (3.4 DNA-Amplifikation).

Das PCR-Programm sah dabei folgende Schritte vor: 94° C, 20 Sekunden; 30 Zyklen 94° C 20 Sekunden; 50° C 20 Sekunden; 60° C 3 Minuten, dann auf 4° C herunterkühlen.

Die amplifizierte DNA wurde mit 100 µl "blue dye acetic buffer" (Dextran-Blau, 0,2 mg/ml; 0,2 M Natriumazetat pH 4,7) gemischt, Präzipitiert mit 250 µl absoluten Ethanol und dann bei 14.000 rpm zentrifugiert für 23 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit 150 µl 70%igen Ethanols gewaschen und bei 60 °C inkubiert.

Für den eigentlichen Sequenzierungslauf wurden die Pellets in 75 % Formamid/25 % 50 mM EDTA pH 8,0, (75 % formamide/25 % 50 mM EDTA pH 8.0) für 3 Minuten bei 90° C in einem Wasserbad erhitzt und in einem Eisblock heruntergekühlt. Die Proben wurden auf ein 6 %iges Acrylamidgel aufgetragen und einem elektrischen Feld auf einem 377 "stretch system" (Applied Biosystems Inc.) über Nacht ausgesetzt.

Die Daten wurden mit Analysis 2,2 program (PE Applied Biosystem) analysiert.

Die Sequenzierungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Albert und Herrn Doktor Witter, Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, Abteilung für Immungenetik, durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Teil der Proben bei der Firma TopLab GmbH, Martinsried, sequenziert.

### 3.8 Bestimmung der p53-Autoantikörper im Serum

Zur Untersuchung von Serum auf p53-Autoantikörper wurde ein käuflicher ELISA-Test (Firma DIANOVA GmbH) verwendet. Es handelt sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA mit rekombinantem p53-Protein, das die anti-p53-Autoantikörper bindet. Mittels peroxidase-konjugiertem anti-Human IgG von Ziegen und folgender Messung einer Peroxidase bedingten Farbstoffumsetzung erfolgt der Nachweis.

Die Proben wurden in einem Proben-Verdünnungspuffer vor Einsatz in dem Assay 1:100 verdünnt und 100 µl pro Well einpipettiert. Nach 60 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgten fünf Waschschrte mit je 200 µl Waschpuffer pro Well. Danach wurden 100 µl Detektor-Antikörper-Lösung pro Well einpipettiert und für 60 Minuten inkubiert. Es folgten wieder die gleichen Waschschrte. Für 30 Minuten wurde dann 100 µl Substratlösung aufgetragen. Diese Reaktion fand im Dunkeln statt. Durch Zugabe von 50 µl Stopplösung pro Well wurde die Enzymreaktion abgebrochen, was einen Farbumschlag von blau nach gelb bewirkt.

Die photometrische Messung erfolgte bei 450 nm Wellenlänge. Durch Multiplizieren der Extinktion des Kalibators mit dem chargenspezifischen Faktor errechnet sich der Cut-off, anhand dessen die Ergebnisse ausgewertet werden. Negative Proben sind kleiner oder gleich, positive sind größer als die Extinktion des Cut-off. Ein kritischer Bereich wird 20 % oberhalb des Cut-off definiert und Proben, die in diesem Bereich fallen, wurden wiederholt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Adenome

Bei den 45 untersuchten Patienten mit kolorektalen Adenomen konnten sieben Mutationen (15,5 %) nachgewiesen werden, drei davon im p53- und vier im ki-ras-Gen.

In der Kontrollgruppe ( n = 38; 20 Männer, 18 Frauen) wurde eine Mutation (2,6 %) im p53-, jedoch keine Veränderung im ki-ras-Gen detektiert.

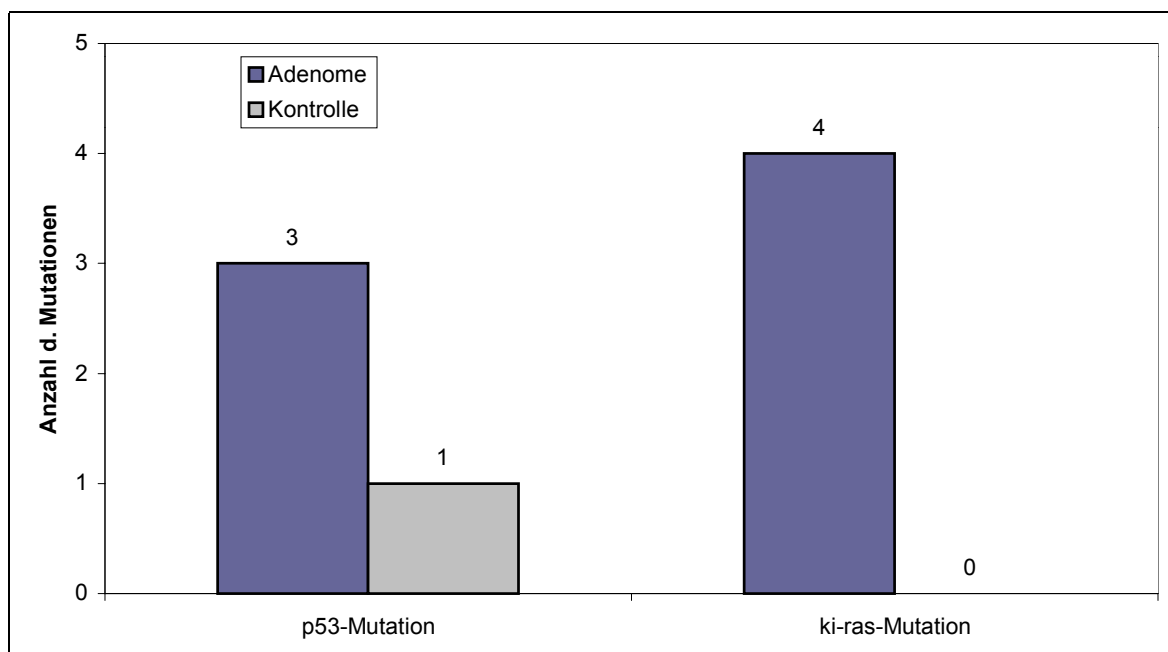


Abbildung 10: Mutationsverteilung von p53 und ki-ras bei den untersuchten Adenomen sowie der Kontrolle

	<b>N =</b>	<b>P53</b>	<b>Ki-ras</b>	<b>Insgesamt</b>	<b>%</b>
<b>Adenome</b>	45	3	4	7	15,5
<b>Kontrolle</b>	38	1	0	1	2,6

Tabelle 7: p53 und ki-ras-Mutationen in der Kolonlavage von Patienten mit Kolonadenomen und der Kontrollgruppe

Die Aufteilung der Mutationen beziehungsweise der Aminosäureumwandlungen durch Aberrationen in Kodon 12 - 13 von Exon 1 des ki-ras-Gens zeigt folgende Auflistung:

- Glycin zu Zystein in Kodon 12
- Glycin zu Asparaginsäure in Kodon 12
- Glycin zu Valin in Kodon 12
- Glycin zu Asparaginsäure in Kodon 13.

Bei der Untersuchung des p53-Gens wurden zweimal in Exon 6 und einmal in Exon 7 Mutationen gefunden.

<b>PATIENTEN / ALTER</b>	<b>ADENOMTYP</b>	<b>ANZAHL / GRÖSSE DER ADENOME IN MM</b>	<b>DYSPLASIEGRAD</b>	<b>MUTATION</b>
<b>1. ♂ 70</b>	tubulovillös	10 / 5-15	hochgradig	ki-ras
<b>2. ♀ 78</b>	tubulovillös	8 / 2-15	geringgradig	ki-ras
<b>3. ♂ 59</b>	tubulovillös	1 / 40	hochgradig	ki-ras
<b>4. ♀ 87</b>	tubulär	3 / 3	geringgradig	ki-ras
<b>5. ♂ 72</b>	tubulär	1 / 5	geringgradig	p53
<b>6. ♂ 79</b>	tubulovillös	1 / 8	geringgradig	p53
<b>7. ♀ 57</b>	tubulovillös	1 / 10	geringgradig	p53

Tabelle 8: Patientencharakteristik, Histologie und Größe beziehungsweise Anzahl der Adenome und Mutationen in der Adenompopulation

## 4.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Es wurden 127 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf Mutationen in der Kolonlavage untersucht: 75 Patienten mit Colitis ulcerosa (38 Männer, 37 Frauen), 52 Patienten mit Morbus Crohn (15 Männer, 37 Frauen), (siehe Abbildung 12).

Bei elf von 75 Patienten (14,6 %) mit Colitis ulcerosa konnten Mutationen im p53- oder ki-ras-Gen aus der Kolonlavage nachgewiesen werden (siehe Tabelle 9). Die elf Mutationen setzen sich aus sechs p53- und fünf ki-ras-Mutationen zusammen. Bei acht von 52 Patienten (15,4 %) mit Morbus Crohn konnten Mutationen nachgewiesen werden, drei im p53- und fünf im ki-ras-Gen. Von den neun p53-Mutationen sind vier im Exon 5 lokalisiert, zwei jeweils in Exon 7 und 8 und eine Mutation in Exon 6. Die ki-ras-Mutationen befanden sich alle in Exon 12: fünf Aminosäurenwechsel von Glycin zu Valin, jeweils zwei von Glycin zu Alanin beziehungsweise Asparaginsäure (Kodon 12) und eine Änderung von Glycin zu Serin waren nachweisbar.

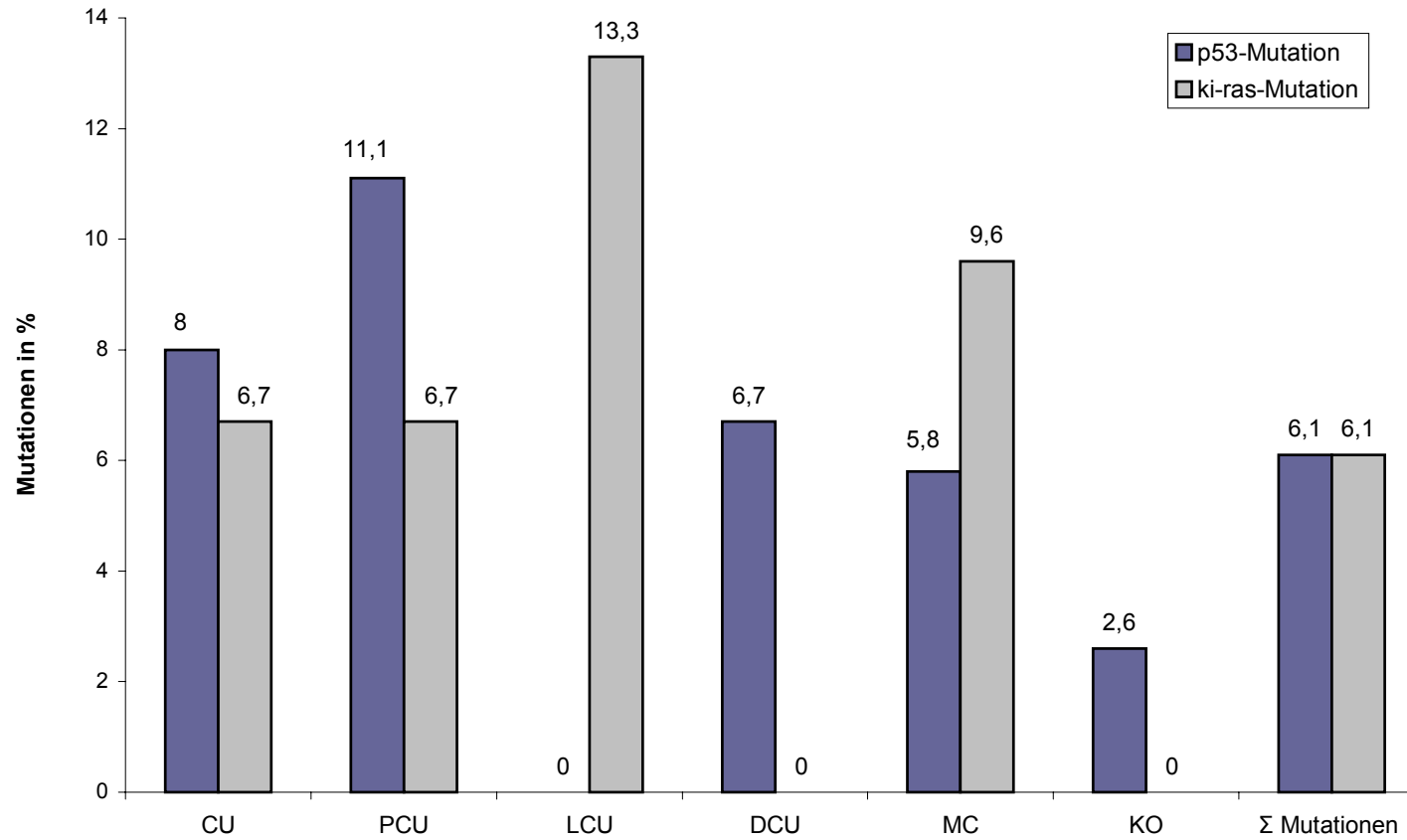
	<b>N =</b>	<b>P53</b>	<b>Ki-ras</b>	<b>Insgesamt</b>	<b>%</b>
<b>Colitis ulcerosa</b>	75	6	5	11	14,7
<b>Pancolitis</b>	45	5	3	8	17,8
<b>Linksseitige Colitis</b>	15	0	2	2	13,4
<b>Distale Colitis</b>	15	1	0	1	6,7
<b>Morbus Crohn</b>	52	3	5	8	15,4
<b>Kontrolle</b>	38	1	0	1	2,6
<b>Gesamt</b>	165	10	10	20	12,1

Tabelle 9: p53 und ki-ras-Mutationen in der Kolonlavage von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

### **4.3 Mutationsanalyse der Adenom- und CED-Population**

Bei allen untersuchten Probanden wurden insgesamt 27 Mutationen nachgewiesen. Die Aufteilung der untersuchten Mutationen bei den Adenomen und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist in den Tabellen 7 beziehungsweise Tabelle 9 und Abbildung 11 dargestellt

#### 4. Ergebnisse



P53-Mutation	n = 6 / 75	n = 5 / 45	n = 0 / 15	n = 1 / 15	n = 3 / 52	n = 1 / 38
Ki-ras-Mutation	n = 5 / 75	n = 3 / 45	n = 2 / 15	n = 0 / 15	n = 5 / 52	n = 0 / 38

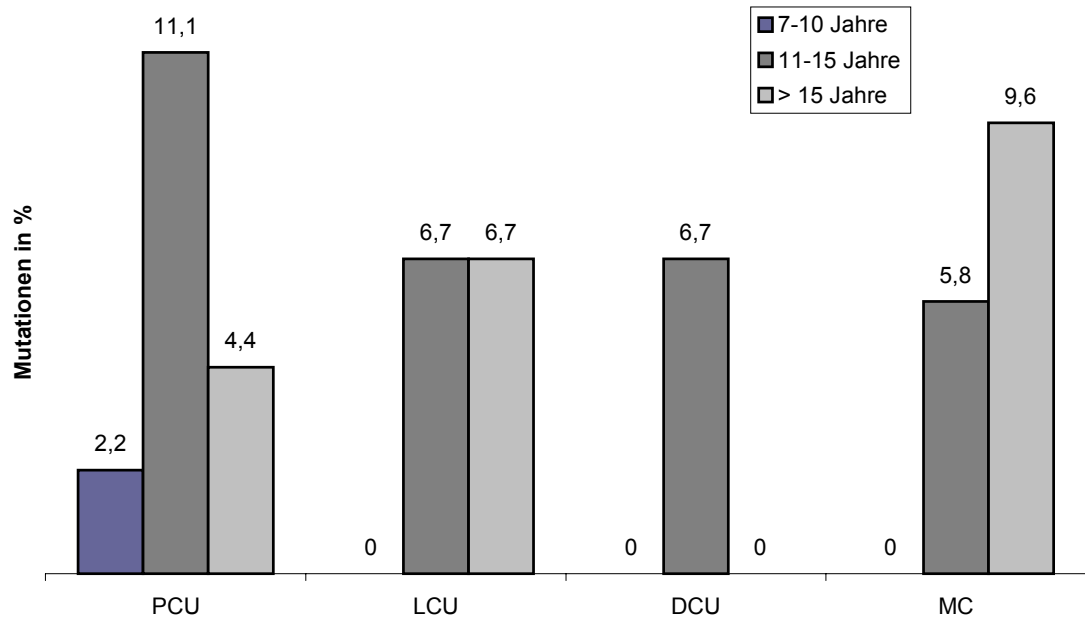
Abbildung 11: Aufteilung der p53- und ki-ras-Mutationen bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit Auflistung der verschiedenen Ausdehnungsformen bei der CU; CED = chronisch entzündliche Darmerkrankungen; CU = Colitis ulcerosa; PCU = Pancolitis ulcerosa; LCU = linksseitige Colitis ulcerosa; DCU = distale Colitis ulcerosa; MC = Morbus Crohn; KO = Kontrollgruppe;  $\Sigma$  Mutationen = Summe aller Mutationen. In der Tabelle sind die zugehörigen Fallzahlen aufgelistet.

Im ki-ras-Gen wurden 14 Mutationen festgestellt. Vier positive Ergebnisse wies die Adenomgruppe, 10 positive die Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf. Im Kontrollkollektiv wurde keine Mutation festgestellt.

Unter allen ki-ras-Mutationen wurden die meisten Aminosäureaustausche in Exon 12 von Glycin zu Valin ( $\Sigma = 6$ ) detektiert, gefolgt von drei Veränderungen von Glycin zu Asparaginsäure. Weiter wurden zwei Wechsel von Glycin zu Alanin gefunden, alle übrigen untersuchten Möglichkeiten des Aminosäureaustauschs wurden nicht beziehungsweise nur einmal nachgewiesen.

Die Verteilung der Mutationen in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist in Abbildung 12 dargestellt. Die meisten Mutationen wurden bei Patienten mit Pancolitis mit einer Krankheitsdauer zwischen 11 und 15 Jahren nachgewiesen (11,1 %; n=5). Bei Morbus Crohn zeigt sich der Trend, dass bei zunehmender Krankheitsdauer mehr Mutationen nachgewiesen werden. Während keine Mutation bei einer Krankheitsdauer bis zu 10 Jahren nachweisbar war, zeigten sich 5,8 % (n=3) Mutationen bei einer Krankheitsdauer von 11–15 Jahren, bei einer Krankheitsdauer über 15 Jahren 9,6 % (n=5).





7–10 J.	n = 1	n = 0	n = 0	n = 0
11–15 J.	n = 5	n = 1	n = 1	n = 3
>15 J.	n = 2	n = 1	n = 0	n = 5
Patienten	n = 45	n = 15	n = 15	n = 52
	PCU	LCU	DCU	MC

Abbildung 12: Krankheitsdauer und Mutationsnachweis in % (in Bezug auf das jeweilige Gesamtkollektiv) bei Patienten mit CED; PCU=Pancolitis ulcerosa, LCU=linksseitige Colitis ulcerosa, DCU=distale Colitis ulcerosa, MC=Morbus Crohn; in der Tabelle sind die zugehörigen, absoluten Zahlen angegeben

#### 4.4 p53-Autoantikörper im Serum

55 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnten auf das Vorliegen von p53-Autoantikörpern untersucht werden. Die Gruppe besteht aus 27 Patienten mit Pancolitis ulcerosa und 28 mit Morbus Crohn. Ein positiver Nachweis gelang bei zwei Patienten mit Morbus Crohn. In der Kolonlavage konnten bei diesen Patienten keine Mutationen im p53- beziehungsweise ki-ras-Gen nachgewiesen werden. Bei dem einen Patienten wurde die Diagnose 1970 gestellt und 1988 eine Ileozökalresektion durchgeführt, bei dem anderen Patienten wurde die Diagnose 1976 erstmals gestellt. Es gelang kein positiver p53-Autoantikörpernachweis im Serum bei Patienten mit Pancolitis ulcerosa.

#### 4.5 Sequenzierung

Aufgrund der hohen Spezifität der Hybridisierung von Dot blots mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden zum Nachweis von ki-ras Mutationen wurden nur positive Ergebnisse der p53-Mutationen in der SSCP-Analyse zur Bestätigung sequenziert. Somit konnte eine Aberration in der genomischen DNA des entsprechenden Exons verifiziert werden.

## 5 Diskussion

Ein chronischer Entzündungsreiz bewirkt eine erhöhte Zellproliferation, wodurch das Mutationsrisiko steigt. Durch entstandene Mutationen von Genen, die Einfluss am Wachstum, an der Regulierung des Zellzyklus und der Apoptose einer Zelle ausüben, unter anderem p53 und ki-ras, entsteht somit ein Wachstumsvorteil mit eingeschränkten Reparaturmechanismen der genomischen DNA. Für die betroffene Zellpopulation erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, in ein aggressives und invasives Wachstum überzugehen. Letztendlich können diese Mechanismen zur malignen Transformation und Entstehung von Karzinomen führen.

Viele Karzinome entstehen auf dem Boden dysplastischer Vorstufen, die ein dem Stadium entsprechendes molekulargenetisches Korrelat zeigen. Sie verlaufen nach der von Vogelstein beschriebenen Epithel-Dysplasie-Karzinomsequenz. Es sind dabei zahlreiche Gene betroffen, unter anderem APC,  $\beta$ -Catenin, ki-ras, DCC und p53 (21, 30, 109). In Gewebe kolorektaler Karzinome lassen sich Mutationen der p53- und ki-ras-Gene in bis zu 70 % beziehungsweise 50 % nachweisen. Der Einfluss der Genprodukte stellt einen wichtigen Schritt in der Tumorgenese dar. Überwiegend bei großen Adenomen mit hochgradigen Dysplasien können Mutationen im ki-ras-Gen nachgewiesen werden, weshalb dem Onkogen eine Promotorfunktion in der Dysplasieentwicklung und der Größenzunahme von Adenomen zugeschrieben werden kann (30, 61).

Alterationen im p53-Gen lassen sich nur selten in Adenomen mit geringgradiger Dysplasie nachweisen und treten gehäuft in hochgradigen Dysplasien von Adenomen und langjährigen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf (84). Diese in der Epithel-Dysplasie-Karzinomsequenz spät eintretende Mutation hat bei der Entdifferenzierung zum Karzinom eine besondere Bedeutung. Bei Adenomen mit hochgradiger Dysplasie akkumuliert das Produkt des mutierten p53-Gens (28, 29, 36, 47, 87). Weshalb es zu einer

Proteinanreicherung in der frühen Phase der Tumorgenese kommt, ist noch nicht ausreichend geklärt. 30–40 % der Tumorpatienten mit p53-Mutationen entwickeln zusätzlich Autoantikörper gegen p53. Es konnte eine enge Korrelation zwischen dem Auftreten von p53-Autoantikörpern und einer p53-Protein Überexpression in den maligne transformierten Zellen nachgewiesen werden (35, 58, 83). Prognostisch kann die Bildung von p53-Autoantikörpern im Serum mit einer aggressiveren Tumorform in Zusammenhang gebracht werden. Die Antikörper gehen mit einem höheren Risiko für Tumorprogression und reduzierten Überlebensraten einher (17, 58, 73, 112). In Fallbeobachtungen konnte ein positiver p53-Autoantikörpertiter Monate bis Jahre vor dem klinischen Nachweis eines Karzinoms gefunden werden (58).

Das frühe Detektieren von p53-Mutationen scheint eine sinnvolle Strategie für eine rechtzeitige Diagnose zu sein, da p53-Mutationen schon in prämaligen Läsionen nachgewiesen werden können. Es gibt Studien, die Körperflüssigkeiten wie bronchoalveoläre Lavage und Sputum bei Bronchialkarzinomen (4, 20, 24), Urin bei urothelialen Karzinomen der Harnblase (23, 104, 110) und Stuhl sowie Kolonlavage bei kolorektalen Karzinomen auf p53-Mutationen untersuchen (26, 27, 69, 78, 93).

Der häufig durchgeführte Haemocult®-Test hat aufgrund begrenzter Sensitivität und Spezifität eine eingeschränkte diagnostische Aussagekraft. Da auch bei einer Koloskopie etwa 15 % aller kolorektaler Adenome nicht nachgewiesen werden, ist die Untersuchung der Kolonlavage auf genetische Aberrationen eine sinnvolle Ergänzung, die falsch negative Ergebnisse zugunsten der Überlebensrate von Patienten mit kolorektalen Neoplasien reduzieren könnte (14, 79).

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie bei kolorektalen Karzinomen bewirkt die akute Entzündung neben dem physiologischen hohen „turn-over“ der Zellregeneration eine vermehrte Zellabstoßung in das Darmlumen (15), so dass es möglich ist, ausreichende Mengen an DNA zur Untersuchung zu extrahieren.

Die Untersuchung der Kolonlavage auf genomische Alterationen ist eine praktikable und etablierte Analyse, die wenig von PCR-störenden Proteinen beeinflusst wird. Vor einer Koloskopie werden durch vorherige Darmreinigung viele verunreinigende Proteine, welche die Extraktion und Amplifikation von genomischer DNA dysplastischer Bereiche behindern, entfernt. Da durch diese Schritte die PCR ermöglicht wird, wird auch ein mögliches Reduzieren mutierter DNA akzeptiert. Studien mit großen Patientenkollektiven unterstreichen die Validität der Technik (53, 54, 100). Lang et al. (54) berichtete über den Mutationsnachweis im ki-ras-Gen mittels PCR und Hybridisierung mit Digoxigeninmarkierten Oligonukleotiden und mit SSCP-Analyse detektierten p53-Mutationen aus Kolonlavage von 14 Patienten mit ausgedehnter, langjähriger Colitis ulcerosa. In der Kolonlavage konnten zwei ki-ras- und eine p53-Mutation nachgewiesen werden. In einer weiteren Studie wurden vier Mutationen im p53-Gen und zwei Mutationen im ki-ras-Gen innerhalb einer Population von 31 Patienten mit langjähriger Colitis ulcerosa nachgewiesen. Stratakis (98) untersuchte koloskopisch gewonnene Lavageflüssigkeit von 46 Patienten auf Mutationen des ki-ras Onkogens sowie p53 Tumorsuppressorgens. 26 Patienten wiesen eine Colitis ulcerosa, 12 eine Divertikulose, Hämorrhoiden beziehungsweise einen koloskopisch unauffälligen Befund auf und jeweils vier Patienten hatten kolorektale Adenome beziehungsweise ein kolorektales Karzinom. Bei zwei beziehungsweise einem von 17 Patienten konnte eine ki-ras- beziehungsweise p53-Mutation nachgewiesen werden. Eine ki-ras-Mutation wurde bei einem von vier Patienten mit sporadischen Kolonkarzinom nachgewiesen, während keine Mutation in dem Kontrollkollektiv vorlag. Später berichteten Potter et al. (74) über die gleiche Methode in einer Gruppe von 40 Patienten mit kolorektalen Karzinomen. Es wurden Mutationen in ki-ras, p53, APC sowie „transforming growth factor- $\beta$  receptor II“ in Gewebeproben der Karzinome mit DNA aus Kolonlavage untersucht und verglichen. Während aus den Gewebeproben insgesamt 26 (45 %) Mutationen detektiert werden konnten, wurden aus der Lavage zwei Mutationen im ki-ras-Gen und zwei Mutationen im p53-Gen nachgewiesen (10 %). In 8 % konnte keine DNA nachgewiesen werden. Die Detektion von ki-ras-Mutationen in Kolonflüssigkeit bei

Patienten ohne Hinweis auf ein kolorektales Karzinom beschreibt Tobi et al. (100). Von 39 Patienten mit erhöhtem Risiko zur Entstehung eines kolorektalen Karzinoms konnte ein bestehendes Karzinom ausgeschlossen werden. Bei sieben Patienten wurde eine Mutation im Allel des ki-ras-Gens, Kodon 12, detektiert. Vier Jahre später wurde bei einem dieser Patienten die Diagnose eines kolorektalen Karzinoms gestellt.

Die Untersuchung von Mutationen verschiedener an der Tumorgenese beteiligten Gene aus der Kolonlavage hat den Vorteil, dass die Extraktion und folgende Amplifikation von Tumor-DNA wegen der PCR-Reaktion hemmenden Faktoren, sogenannten disturbing proteins, aus Fäzes weitgehend fehlen. Auch ist der Anteil mutierter DNA im Stuhl geringer. Deutliche Nachteile sind jedoch, dass für die Untersuchung von Mutationen aus der Kolonlavage eine Koloskopie notwendig ist, die ein invasives Verfahren mit wenig Akzeptanz für den Patienten darstellt. Auch der zeitliche und personelle Aufwand mit den damit verbundenen Kosten sind Faktoren, die eine Untersuchung für viele Patienten im Rahmen einer Screeninguntersuchung nicht ermöglichen.

Sidransky et al. konnte ki-ras-Mutationen in acht von neun Stuhlproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom und gesicherter Mutation in Gewebeproben nachweisen (90). Andere Arbeitsgruppen konnten in kleinen Fallzahlen ähnliche Ergebnisse beschreiben (2, 69, 93). Villa et al. konnte nur in Stuhlproben von Patienten mit aktiven Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ki-ras-Mutationen nachweisen (107).

Auf drei genetische Marker, p53, ki-ras und BAT26, untersuchten Dong et al. Stuhl im Vergleich mit Gewebe von 51 Patienten mit kolorektalen Karzinomen (26). Bei 30 Patienten konnten im Tumorgewebe und im Stuhl p53-Mutationen nachgewiesen werden, 3 BAT26-Deletionen wurden sowohl im Tumorgewebe als auch im Stuhl nachgewiesen und Mutationen in Kodon 12 und 13 des ki-ras-Gens wurden bei 19 von 50 Patienten im Tumor und bei 8 von 50 Patienten im Stuhl nachgewiesen. Es wurden keine Mutationen im Stuhl nachgewiesen, die nicht gleichzeitig auch im Tumorgewebe nachweisbar waren.

So konnte mit den 3 Tumormarkern zusammen 36 von 51 (71 %) Patienten mit kolorektalen Karzinomen detektiert werden. Bei 36 von 39 Patienten (92 %) mit Mutationsnachweis im Gewebe konnten auch im Stuhl Mutationen nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wiesen 15,6 % aller Patienten mit Adenomen eine Mutation in p53 oder ki-ras auf, in der Kontrollgruppe waren es knapp 3%. Zwei Patienten mit hochgradiger Dysplasie wiesen eine genomische Mutation in der Kolonlavage auf. Hingegen zeigten sich bei fünf weiteren Patienten mit hochgradiger Dysplasie weder eine Mutation im p53- noch im ki-ras-Gen. Bei der limitierten Fallzahl dieser Studie ließ sich keine Beziehung zwischen dem histopathologischen Grad der Dysplasie und der Detektion von Mutationen nachweisen.

Weiter konnte keine Korrelation zwischen der Größe sowie der Anzahl von Polypen mit dem Mutationsnachweis festgestellt werden. Bei drei Patienten mit Mutationen in der Kolonlavage wurden multiple Adenome diagnostiziert. Hingegen konnten bei 25 Untersuchten mit mehreren Adenomen keine Aberrationen im p53- oder ki-ras-Gen detektiert werden. Ein gleiches Bild zeigte sich bei der Größe von Adenomen. Bei vier Patienten mit großen Adenomen, wobei die Größe mindestens 10 Millimeter Durchmesser betragen, wurden Mutationen festgestellt, 23 Patienten mit Adenomen gleicher Mindestgröße hatten jedoch keine Mutationen in der Kolonlavage, obgleich das Malignitätsrisiko und damit auch die Mutationswahrscheinlichkeit bei multiplen sowie großen Adenomen erhöht ist. Grund für die fehlende Korrelation zwischen Größe und Anzahl der Adenome mit dem Mutationsnachweis kann in der zu geringen Fallzahl sowie der unselektierten Größe und Anzahl der Polypen liegen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass es möglich ist, Mutationen in der Kolonlavage bei Patienten mit Adenomen nachzuweisen. Nachfolgestudien mit einer größeren Anzahl an Patienten sollen klären, ob die Untersuchungen auf genomische Mutationen in der Kolonlavage eine diagnostische Verbesserung für Risikopatienten bringt.

Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden bei 15,0 % Mutationen nachgewiesen. Von 75 untersuchten Patienten mit Colitis ulcerosa wiesen 11 eine Mutation in der Kolonlavage auf (14,7 %), davon sechs im p53- und fünf im ki-ras-Gen. Die Mutationshäufigkeit unterschied sich entsprechend des Kolonbefalls. Patienten mit langjähriger Pankolitis hatten am häufigsten Mutationen (17,8 %), gefolgt von Patienten mit linksseitiger (13,4 %) beziehungsweise distaler Kolitis (6,7 %). Bei 52 Morbus Crohn-Patienten konnten acht Mutationen nachgewiesen werden, davon drei p53- und fünf ki-ras-Mutationen. Es zeigte sich, dass Mutationen bei fortgeschrittener Krankheitsdauer häufiger sind. Bei einer Krankheitsdauer von 7 bis 10 Jahren war keine genomische Aberrationen nachweisbar, wo hingegen bei einer Krankheitsdauer von 11 bis 15 Jahren 5,8 % (n=3) und bei über 15jährigen Krankheitsverlauf 9,6 % (n=5) Mutationen nachgewiesen wurden. Die Ergebnisse unterstreichen die Tatsache, dass der Mutationsnachweis mit fortschreitender Krankheitsdauer sowie mit zunehmender Ausbreitung im Kolon beziehungsweise Rektum ansteigt, was der Theorie der Tumorgenese entspricht. Prämaligene Areale mit p53- und ki-ras-Mutationen könnten so bei Risikopatienten ausfindig gemacht werden.

Die detektierten p53-Mutationen der untersuchten Patienten wurden mit DNA-Sequenzierung verifiziert, wodurch die Sensitivität des SSCP-Verfahrens bestätigt wird.

Serum-Antikörper gegen p53 konnten bei zwei Patienten (7,3 %) mit langjährigen Morbus Crohn, jedoch nicht bei Colitis ulcerosa diagnostiziert werden. Die Patienten mit den positiven Befunden im Serum wiesen keine Mutationen im p53- und ki-ras-Gen auf.

In der Kontrollgruppe wurde in der Kolonlavage eine Mutation im p53-Gen (Exon 5) bei einer 54jährigen Patientin detektiert. In der Koloskopie konnte makroskopisch keine pathologische Veränderung der Mucosa festgestellt werden. Durch Endoskopie des oberen Darmtraktes, abdominelle Sonographie, Röntgen-Kontrastuntersuchung des Gastrointestinaltraktes, CT-Aufnahmen sowie konventionelle Röntgenuntersuchung des



oberen Thorax wurden Neoplasien im gesamten Verdauungstrakt, der Leber, der Lunge sowie des Pankreas ausgeschlossen. Innerhalb von zwei Jahren unterzog sich die Patientin weiterer Untersuchungen, die jedoch auf keine neoplastische Läsionen hinweisen. Familienanamnestisch stellte sich heraus, dass die 67 jährige Mutter der Patientin an einem Pankreaskarzinom verstarb. Aufgrund der Familienanamnese besteht ein erhöhtes Risiko, ebenfalls an einem Malignom zu erkranken und dieser Befund könnte auf eine in Zukunft entstehende maligne Transformation hinweisen.

Die Tumornachsorge von Patienten mit kolorektalen Karzinomen steht den gleichen diagnostischen Problemen wie die Diagnose des primären Karzinoms gegenüber. Bei einem diagnostizierten Karzinom können die Ergebnisse der Untersuchung auf Mutationen im p53- und ki-ras-Gen aus der Kolonlavage vor der Diagnose mit den Ergebnissen danach verglichen werden. Der Verlauf bei wiederholten Untersuchungen könnte über den Erfolg nach chirurgischer Intervention, Radiatio oder chemotherapeutischer Therapie bewertet werden und unter Umständen auf ein Rezidiv oder eine Metastasierung hinweisen. Liegt ein negativer Mutationsnachweis unmittelbar nach therapeutischer Intervention vor und wird nach einiger Zeit wieder positiv, beziehungsweise steigt der Titer der Serum-Autoantikörper gegen p53 an, so könnten weitere diagnostische Untersuchungen unter Umständen ein Rezidiv bestätigen. Diese zusätzlichen molekularbiologischen und immunologischen Untersuchungen können eine Verbesserung des Screeningverfahrens in der Tumornachsorge darstellen. In wie weit sich die diagnostische Lücke der Koloskopie (15 % der Dysplasien werden übersehen) (14, 79) schließen lässt wird sich in Nachfolgestudien mit erhöhter Fallzahl zeigen. Aufgrund der geringen Akzeptanz von Patienten zur Durchführung einer Koloskopie, dem damit verbundenen Aufwand und der Kosten, sind leichter durchführbare Untersuchungen für eine große Anzahl an Patienten, da das kolorektale Karzinom zu den häufigsten Malignomen weltweit gehört, aussichtsreicher.

Wenig invasive Nachweismethoden wie der direkte p53- oder ki-ras-Mutationsnachweis (7, 59) im Serum können das Screening weiter vervollständigen. So untersuchten Borchers et

al. Seren von 16 Patienten mit kolorektalem Karzinom, 6 Patienten mit großen kolorektalen Adenomen, 3 Patienten mit Morbus Crohn und 4 mit Colitis Ulcerosa auf *ki-ras*-Mutationen (16). Bei 5 Patienten (31 %) mit kolorektalem Karzinom und 2 Patienten (50 %) mit langjähriger Pancolitis Ulcerosa konnten Mutationen nachgewiesen werden. Weiter können sensitivere Untersuchungstechniken wie Fluorescence PCR oder „radiolabeled-probe Hybridisierungen“ die Detektion von Punktmutationen steigern (74). Die Begrenzung auf die „hot-spots“ könnten auf größere Abschnitte der zu untersuchenden Gene ausgeweitet werden, so dass Aussagen zu den bestimmten Genen und nicht nur zu einzelnen Nucleotid-Sequenzen gemacht werden können.

Da es sich bei dem kolorektalen Karzinom um eine „heterogene“ Gruppe von molekulargenetischen Veränderung handelt, scheinen gleichzeitige Analysen mehrerer an der Onkogenese beteiligten Gene, zum Beispiel APC,  $\beta$ -Catenin und DCC sinnvoll.

Der Mutationsnachweis aus Stuhl kann neben den oben erwähnten Markern zusätzlich durch Mikrosatelliteninstabilitäten, zum Beispiel BAT26 (1, 2), bei verbesserten Nachweismethoden, auch aufgrund der nicht invasiven Untersuchung und der dadurch gegebenen breiten Anwendungsmöglichkeit, erweitert werden und so eine sinnvolle und unterstützende Diagnostik zu den bereits etablierten Methoden darstellen.

## 6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom gehört weltweit zu den häufigsten Todesursachen bei Tumorerkrankungen. An der Tumorgenese sind verschiedene Gene, beziehungsweise deren Mutationen beteiligt. Je nach Tumorstadium können der Adenom-Karzinom-Sequenz Mutationen bestimmter Tumorsuppressor- oder Onkogene zugeordnet werden. Wichtige Schritte stellen hier Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 und des Onkogens ki-ras dar. Der Haemocult®-Test und die Koloskopie weisen eine begrenzte Sensitivität und Spezifität beziehungsweise zusätzlich ein invasives Verfahren auf. Molekularbiologische Untersuchungen verschiedener an der Tumorgenese beteiligter Gene könnten zu einer Verbesserung des Screeningverfahrens in der Tumovor- und auch Nachsorge führen.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten Mutationen dieser Gene bei Patienten mit kolorektalen Adenomen sowie mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen werden. Mutationen in Kodon 12 und 13, Exon 1, im ki-ras-Gen wurden mittels Hybridisierung von Dot-blot mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden, die p53-Mutationen wurden mittels SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) in einer Elektrophorese untersucht. Bei 15,6 % der untersuchten Patienten mit Adenomen, versus 2,6 % in der Kontrollgruppe, wurden Mutationen nachgewiesen. Jedoch konnte in der untersuchten Fallzahl keine Korrelation zwischen der Größe sowie der Anzahl von Adenomen mit dem Mutationsnachweis festgestellt werden.

Bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn wurden 14,7 % beziehungsweise 15,4 % Mutationen des p53- beziehungsweise ki-ras-Gens nachgewiesen. Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen dem Mutationsnachweis und der kolorektalen Ausbreitung sowie der fortschreitenden Krankheitsdauer, entsprechend der Tumorgenese bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Zudem konnten bei zwei Patienten mit

Morbus Crohn p53-Autoantikörper im Serum nachgewiesen werden. Hier bestand jedoch keine Korrelation mit dem Mutationsnachweis in der Lavage.

Das Spektrum der Tumormarker sollte bezüglich APC,  $\beta$ -Catenin, DCC und dem Mikrosatellitenmarker BAT26 erweitert und sensitivere Untersuchungstechniken für Serum und Stuhl (zum Beispiel Genocult®) etabliert werden, damit Risikopatienten zur Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms früher diagnostiziert werden können.

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1 : Modell der Epithel-Dysplasie-Karzinomsequenz	18
Abbildung 2: Ki-ras, Exon 1, mit den Primern PA 11 und PA 12	31
Abbildung 3: Nylon-Membran	36
Abbildung 4: Positive Signale bei Hybridisierung von Wildtyp – DNA	38
Abbildung 5: Positive Signale bei Hybridisierung	39
Abbildung 6: Mutation bei Hybridisierung	40
Abbildung 7: Polyacrylamidgel–Elektrophorese	43
Abbildung 8: SSCP-Elektrophorese mit einer Mutation	44
Abbildung 9: SSCP-Elektrophorese mit Wildtyp-DNA	46
Abbildung 10: Mutationsverteilung von p53 und ki-ras bei Adenomen und Kontrolle	49
Abbildung 11: Aufteilung der p53- und ki-ras-Mutationen bei CED	55
Abbildung 12: Krankheitsdauer und Mutationsnachweis in % bei Patienten mit CED	57

Tabelle 1: Anzahl, Alter und Geschlecht der untersuchten Populationen	26
Tabelle 2: Primer PA 11- und PA 12-Sequenz	30
Tabelle 3: Primer für p53-Amplifikation	32
Tabelle 4: PCR-Protokoll	33
Tabelle 5: Oligonucleotidsequenzen von Kodon 12 und 13	37
Tabelle 6: Exon 1-Sequenz von ki-ras	41
Tabelle 7: p53 und ki-ras-Mutationen bei Adenomen	50
Tabelle 8: Patientencharakteristik der Adenompopulation	51
Tabelle 9: p53 und ki-ras-Mutationen von Patienten mit CED	53

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahlquist DA, Shuber AP: Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers. *Clin Chim Acta* 2002; 315: 157-168
2. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, et al.: Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay system. *Gastroenterology* 2000; 119: 1219-1227
3. Ahnen DJ: Colon cancer prevention by NSAIDs what is the mechanism of action? *Eur J Surg Suppl.* 1998; 582: 111-114
4. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, Herman JG, Wu L, Decker PA, Jen J, Sikransky D: Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 332-339
5. Allgayer H, Tillmann T, Hombach A, Kruis W, Pohl C: Aminosalicylates and aspirin for colonic cancer: from anti-inflammatory to antineoplastic drugs? *Gastroenterol* 2000; 38(12): 963-70
6. Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutherland DJ, Kellen JA, Bunting PS: Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. *Int J Cancer* 1994; 58: 480-487
7. Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Chen XQ, Stroun M, Mulcahy HE, Farthing MJ: k-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997; 112: 1114-1120

8. Anwar S, White J, Hall C, Farrell WE, Deakin M, Elder JB; Sporadic colorectal polyps: Management options and guidelines. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34 (1): 4-11
9. Atkin WS, Morson BC, Cuzik J: Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992; 326: 658-662
10. Bar-Sagi D, Feramisco JR: Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 1985; 42: 841-848
11. Baker SJ, Fearon ER, Nirgro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, et al.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-221
12. 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
13. Bennett WP: P53 alterations in progenitor lesions of the bronchus, esophagus, oral cavity, and colon. *Cancer-Detect-Prev* 1995; 19 (6): 503-511
14. 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
15. 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
16. 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



17. Bourhis J. et al.: Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 1996; 188 (17); 1288-1233
18. Boyle P, Zaridze DG, Smans M: Descriptive epidemiology of colorectal cancer. *Int J Cancer* 1985; 36 : 9-15
19. Bresalier RS., Kim YS: Malignant neoplasms of the large intestine ; in : Feldmann M., Scharschmidt BF, Sleisenger MH (ed): *Gastrointestinal and Liver Disease*. WB Saunder Company, Philadelphia, 1993, Vol. 2, pp 1906-1942
20. Chen JT, Ho WL, Cheng YW, Lee H: Detection of p53 mutations in sputum smears precedes diagnosis of non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20: 2687-2690
21. Cho KR, Vogelstein B: Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992; 70: 1727-1731
22. Chung DC: The genetic basis of colorectal cancer: Insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000; 119: 854-865
23. Dahse R, Utting MM, Werner W. Schimmel B, Claussen U, Junker K: TP53 alterations as a potential diagnostic marker in superficial bladder carcinoma and in patients serum, plasma and urine samples. *Int J Oncol* 2002; 20: 107-115
24. Dai Y, Morishita Y, Mase K, Sato N, Akaogi E, Mitsui T, Noguchi M: Application of the p53 and K-ras gene mutation patterns for cytologic diagnosis of recurrent lung carcinomas. *Cancer* 2000; 90: 258-263
25. Daus H, Trumper L, Bürger B, Jacobs G, Kriener S, v. Blohn G, Zeitz M, Pfreundschuh M: Ki-ras-Mutation als molekulargenetischer Tumormarker für Pankreaskarzinome. *Dtsch med Wschr* 1995; 120: 821-5

26. Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, Hivi K, Goodman SN, D'Allesio M, Paty P, Hamilton SR, Sidransky D, Barany F, Levin B, Shuber A, Kinzler KW, Vogelstein B, Jen J: Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 858-865
27. Eguchi S, Kohara N, Komuta K, Kanematsu T: Mutations of the p53 gene in the stool of patients with respectable colorectal cancer. *Cancer* 1996; Suppl 77: 1707-1710
28. Ekbohm AM: Cancer risk in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterology* 1995; 9: 23-26
29. Ekbohm A, Helmick Ch, Zack M, Adami H-O: Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *NEJM* 1990; 323: 1228-33
30. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767
31. Fournier DB, Gordon GB: COX-2 and colon cancer: potential targets for chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* 2000; 34: 97-102
32. Fricke H, Urban S, Noehl N, Folwaczny C: Serum p53 antibodies in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 899-901
33. George SM, Makinen MJ, Jernvall P, Makela J, Vihko P, Karttunen TJ: Classification of advanced colorectal carcinomas by tumor edge morphology. *Cancer* 2000. 89 (9): 1901-1909
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. Green JA, et al.: Serum p53 autoantibodies: Indices in familial breast cancer. *Eur J Cancer* 1994; 30 A (5): 580-584
36. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN: Ulcerative colitis and Crohn`s disease. *Am J Gastroenterology* 1996; 91:44-8
37. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN: Ulcerative colitis and Crohn`s disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 1994; 35: 1590 - 1592.
38. Hahn SA, Kern SE, Schmiegel WH: Molekularbiologische Veränderungen bei gastrointestinalen Tumoren. Diagnostische und therapeutische Perspektiven. *Dt Ärzteblatt* 1995; 92: B157-163
39. Hammel P, Boissier B, Chaumette M-T, Piedbois P, Rottman N, Kouyoumdjian J-C, Lubin R, Delchier J-C, Soussi T: Detection and monitoring of serum p53 antibodies in patients with colorectal cancer. *Gut* 1997; 40 :356-61
40. Harris, C.C: p53: At the Crossroads of Molecular Carcinogenesis and Risk Assessment. *Science* 1993; 262: 1980-1981.
41. Herbay von A, Schmid RM, Adler G: Kolorektale Karzinome bei Morbus Crohn. *Dtsch med Wschr* 1999; 124: 940-944
42. Heilbrun LK, Nomura A, Hankin JH, Stemmermann GN. Diet and colorectal cancer with special reference to fiber intake. *Int J Cancer* 1989; 44: 1-6
43. Hiyama T, Yokozaki H, Shimamoto F, Haruma K, Yau W, Kajiyama G, Tahara E: Frequent p53 gene mutations in serrated adenomas of the colorectum. *J Pathol* 1998; 186 (2): 131-139

44. Höltnke JK, Sagner G, Kessler Ch, Schmitz G. Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids. *Bio Techniques* 1992; 12: 104-113
45. Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham AJ, Swenberg JA, Marrogi AJ, Harris CC: Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 2000; 60: 3333-3337
46. Kadakia-SC, Wroblewski CSW, Kadakia AS, Meier NJ: Prevalence of proximal colonic polyps in average-risk asymptomatic patients with negative fecal occult blood tests and flexible sigmoidoscopy. *Gastrointest-Endosc* 1996; 44 (2): 112-7
47. Katzka I, Brody RS, Morris E, Katz S: Assessment of colorectal cancer risk in patients with ulcerative colitis: experience from a private practice. *Gastroenterology* 1983; 85:22-9
48. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR: Allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA* 1989; 261: 3099-3103
49. Kirk GR, Clements WD: Crohn's disease and colorectal malignancy. *Int J Clin Pract* 1999; 53 (4): 314-315
50. Ko JM, Cheung MH, Wong CM, Lau KW, Tang CM, Kwan MW, Lung ML: Ki-ras codon 12 point mutational activation in Hong Kong colorectal carcinoma patients. *Cancer Lett* 1998; 1345 (2): 169-176
51. Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ: New concepts of molecular biology for colon carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2000; 47 (35): 1291-1297

52. Kressner U, Bjorheim J, Westring S, Wahlberg SS, Pahlman L, Glimelius B, Lindmark G, Lindblom A, Borresen-Dale AL. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1998; 34(4): 518-521
53. Lang SM, Heinzlmann M, Stratakis DF, Teschauer W, Loeschke K: Detection of ki-ras mutations and differential hybridisation 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
54. 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 conformation polymorphism analysis and differential hybridisation in colonic lavage fluid. *Gut* 1999; 44: 822-825
55. Lennard-Jones JE, Melville DM, Morson BC, Ritchie JK, Williams CGB: Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut* 1990; 31: 800-806.
56. Lipper S, Kahn LB, Sandler RS, Varma V: Multiple juvenile Polyposis. A study of the pathogenesis of juvenile polyps and their relationship to colonic adenomas. *Hum. Pathol* 1981; 12 :804
57. Lohr M, Maisonneuve P, Lowenfels AB: K-Ras mutations and benign pancreatic disease. *Int J Pancreatol* 2000; 27: 93-103
58. Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, Tredaniel J, Legros Y, Cazals D, Hisch A, Sussi T: Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature Medicine* 1995; 1 (87): 701-702
59. Mayall F, Jacobsen G, Wilkins R, Chang B: Mutations of p53 can be detected in the plasma of patients with large bowel carcinoma. *J Clin Pathol* 1998; 51: 611-613

60. Mellekjaer L, Johansen C, Gridley G, Linet MS, Kjaer SK, Olsen JH: Crohn's disease and cancer risk. *Cancer Causes Control* 2000; 11 (2): 145-150
61. Michelassi, F, Erroi F, Roncella M, Block GE: Ras oncogene and the acquisition of metastasizing properties by rectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 1989; 32 : 665-668
62. Miller BA, Kolonel LN, Bernstein L, Young, Jr. JL, Swanson GM, West D, Key CR, Liff JM, Glover CS, Alexander GA, et al.: Racial/Ethnic Patterns of Cancer in the United States 1988-1992, National Cancer Institute. NIH Pub. No. 96-4104. Bethesda, MD, 1996
63. Moran EM: Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002; 21: 193-201
64. 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
65. 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
66. 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
67. Newcomb PA, Norfleet RG, Storer BE, Surawicz TS, Marcus PM: Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1572-1575

68. Noda M, Ko M, Ogura A, Liu D\_G, Amano T, Takano T, Ikawa Y: Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line; *Nature* 1985; 318: 73-75
69. Nollau P, Moser C, Weinland G, Wagener C: Detection of k-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR. *Int J Cancer* 1996; 66: 332-326
70. 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: 2766-70
71. Orth M, Gansauge F, Gansauge S, Beger HG, Adler G, Schmid RM: K-ras mutations at codon 12 are rare events in chronic pancreatitis. *Digestion* 1998; 59: 120-124
72. Otchy DP, Ransohoff DF, Wolff BG, Weaver A, Ilstrup D, Carlson J, Rademacher D: Metachronous colon cancer in persons who have had a large adenomatous polyp. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 448-464
73. Peyrat JP, Bonnetterre J, Lubin R, Vanlemmens L, Fournier J, Soussi Th : Prognostic significance of circulation p53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer. *Lancet* 1995; 345: 621-622
74. Potter MA, Moris 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
75. Pohl C, Hombach A, Kruis W: Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47 (31): 57-70

76. Raedle J, Oremek G, Welker M, Roth WK, Caspary WF, Zeuzem S: P53 autoantibodies in patients with pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Pankreas* 1996; 13: 241-246
77. Rasmussen M, Kronborg C, Fenger C, Jorgensen OD: Possible advantages and drawbacks of adding flexible sigmoidoscopy to hemocult-II in screening for colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 73-78
78. Ratto C, Flamini G, Sofo L, Nucera P, Ippoliti M, Curigliano G, Ferretti G, Sgambato A, Merico M, Doglietto G.B, Cittadini A, Crucitti F: Detection of oncogene mutation from neoplastic colonic cells exfoliated in feces. *Dis Colon & Rektum* 1996; 39: 1238-1244
79. Rex DK, Lehman 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
80. Riede U-N, Schaefer H-E: *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 3. Auflage 1993, Georg Thieme Verlag Stuttgart
81. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP: p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87 (19): 7555-7559
82. Roh H, Green, DW, Boswell CB, Pippin JA, Drebin JA: Suppression of  $\beta$ -Catenin inhibits the neoplastic growth of APC-mutant colon cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 6563-6568
83. Ryder SD, Rizzi PM, Volkmann M, Metivier E, Pereira LM, Galle PR, Naoumov NV, Zentgraf H, Williams R: Use of specific ELISA for the detection of antibodies directed against p53 in patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 1996; 49: 295-299



84. 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 (6): 980-984
85. Schmiegel, W, Adler, G, Frühmorgen P, Fölsch U, Graeven U, Layer P, Petrasch S, Porschen R, Pox C, Sauerbruch T, Schmoll J-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
86. Selby JV, Friedmann GD, Quesenberry CP, Weiss NS: A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1992; 326: 653-657
87. Shan L, Nakamura Y, Zhang Z, Jing X, Nakamura M, Murakami M, Yokoi T, Kakudo K: Overexpression of p53 protein correlates with a high risk of malignant transformation of adenomas in patients with multiple colorectal adenomas. *Pathol Int* 1998; 48 (4): 281-286
88. Shomori K, Sakatani T, Goto A, Matsuura T, Kiyonari H, Ito H: Thymidine phosphorylase expression in human colorectal mucosa, adenoma and carcinoma: role of p53 expression. *Pathol-Int.* 1999; 49(6): 491-499
89. Sidransky D: Nucleic acid-based methods for the detection of colorectal cancer. *Science* 1997; 278: 1054-1058.
90. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B: Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with respectable colorectal cancer. *Science* 1992; 256: 102-105

91. Singh AK, Trotman BW: Use and safety of aspirin in the chemoprevention of colorectal cancer. *J Assoc Acad Minor Phys* 1998; 9 (2): 40-44
92. 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
93. Smith-Ravin J, England J, Talbot IC, Bodmer W: Detection of c-Ki-ras mutations in faecal samples from sporadic colorectal cancer patients. *Gut* 1995; 36: 81-86
94. Sonnenberg, A: Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991; 100: 143-149
95. Soussi T: The humoral response to the tumor-suppressor gene-product p53 in human cancer implications for diagnosis and therapy. *Immunol Today* 1996; 17: 35-46
96. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B: Mutational analysis of the APC/ $\beta$ -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1130-1134
97. Spink KE, Fridman SG, Weis WI: Molecular mechanisms of  $\beta$ -catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC- $\beta$ -catenin complex. *EMBO Journal* 2001; 20: 6203-6212
98. Stratakis, DF: Nachweis von Mutationen des K-ras Onkogens und des p53 Tumorsuppressorgens in koloskopischer Lavageflüssigkeit zur Früherkennung maligner Entartung bei Patienten mit langjähriger Colitis ulcerosa. Medizinische Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München 2000
99. Teschauer W, Mussack T, Braun A, Waldner H, Fink E: Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: a study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 125-133

100. Tobi M, Luo GCH, 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
101. Toribara NW, Sleisenger MH: Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1995; 332: 861-867
102. Towler B, Irwig L, Glasziou P, Kewenter J, Weller D, Silagy C: A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the fecal occult blood test, hemoccult. *BMJ* 1998; 317 : 559-565
103. Ulvik A, Aarskog NK, Ogreid D: Detection and identification of Ki-ras exon 1 mutations by minigel single-strand confirmation polymorphism. *Anal Biochem* 1995; 232: 137-138
104. van Rhijn BW, Lurkin I, Kirkels WJ, van der Kwast Th, Zwarthoff EC: Microsatellite analysis – DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial. *Cancer* 2001; 92: 768-775
105. 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
106. Verlaan-de Vries M, Bogaard ME, Van der Elst H, Van Boom JH, Van der Eb AH, Bos JL: A dot-blot screening procedure for mutated ras oncogenes using synthetic oligodeosynucleotides. *Gene* 1986; 50: 313-320
107. Villa E, Dugani A, Rebecchi AM, Vignoli A, Grottola A, Buttafoco P, Losi L, Perini M, Trande P, Merighi A, Lerose R, Manenti F: Identification of subjects at risk for colorectal carcinoma through a test based on k-ras determination in the stool. *Gastroenterology* 1996; 110: 13446-1353

108. Vogelstein F, Kinzler KW: P53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526
109. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal tumor development. *New Engl J Med* 1988; 319: 525-532
110. von Knobloch R, Hegele A, Brandt H, Olbert P, Heidenreich A, Hofmann R: Serum DNA and urine DNA alterations of urinary transitional cell bladder carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis. *Int J Cancer* 2001; 94: 67-72
111. Wagenaar RA, Crawford HC, Matrisian LM: Stabilized beta-catenin immortalizes colonic epithelial cells. *Cancer Res* 2001; 61(5):2097-104
112. Werner JA et al.; p53 serum antibodies as a prognostic indicator in head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 44 (2): 112-116
113. Winawer SJ, Fletcher Rh, Miller L et al: Colorectal cancer screening: Clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997; 112: 594-642
114. 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 (5): 374-382
115. Yin J, Harpaz N, Tong Y et al. P53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology* 1998; 104: 1633-1639

Lebenslauf

Name	Sven Neynaber
Geburtsdatum	26.07.1971
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung	1979 – 1992: Eutin, Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
Zivildienst	1992 – 1993: Privatklinik Dr. Riefler, München
Praktikum	1993 – 1994: Privatklinik Dr. Riefler, München
Hochschulbildung	Oktober 1994 bis März 1997 Vorklinik an der Universität Leipzig April 1997: Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität, München März 1998: 1. Staatsexamen März 2000: 2. Staatsexamen April 2001: 3. Staatsexamen
Praktisches Jahr LMU	04.2000 – 03.2001, Wahlfach Dermatologie
AIP und Assistenzarzt	Seit 07.2001 Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München

## DANKSAGUNGEN

Herrn PD Dr. C. Folwaczny danke ich für die Übernahme der Dissertation, die Betreuung, konstruktive Kritik und Führung der Arbeit in praktischen und theoretischen Fragen, für wichtige Anregungen sowie die zeitaufwendige und geduldige Korrektur der Aufzeichnungen.

Herrn Prof. Dr. K. Loeschke danke ich für die Überlassung des Themas, das positive Interesse sowohl an den Ergebnissen als auch den Problemen, und für anstehende Fragen stets Zeit und Antwort gehabt zu haben.

Frau Dr. M. Heinzlmann danke ich für die aufwendige Einarbeitung in die Methodik, für die Bemühungen, mir in Praxis und Theorie Hilfe zu geben, für die Vorkorrektur vieler Kapitel sowie für die gesamte Betreuung der Arbeit.

Frau M. Petrovitsch danke ich herzlich für die gute kooperative Zusammenarbeit, für die Unterstützung auf geistigem und fachlichen Wege und die offene Bereitschaft, bei vielen Problemen mit Rat zu Seite zu stehen.

Herrn Dr. K. Witter danke ich für den Aufwand und die Bemühungen, die Sequenzierungen durchzuführen, kritisch auszuwerten und mir mit fachlichem Wissen weitere Einblicke in die komplexe Theorie und Praxis der Sequenzierung zu ermöglichen sowie auch sonstige molekulargenetische Fragen zu beantworten.

Herrn Professor Albert danke ich für die rasche und unkomplizierte Kooperation, bei Fragen der Sequenzierung sowie der Durchführung der Untersuchungen Hilfe zu geben und die Laboratorien zur Verfügung zu stellen.