

Aus der Chirurgie Klinik A der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. H.D. Röher

**K-*ras*- und E-Cadherin-Mutationen bei kolorektalen Neoplasien,  
angrenzendem Normalgewebe und chronisch entzündlichen  
Darmerkrankungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

Susanne Siebeneicher

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Röher

Korreferent:: Prof. Dr. Gabbert

Meiner Mutter und meinem Vater,  
der die Fertigstellung der Arbeit mit großem Interesse verfolgte  
und gerne miterlebt hätte.

## Inhaltsverzeichnis

Seite

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
I.1	Epidemiologie	1
I.2	Ätiologie der Tumorentwicklung	1
I.3	Tumorigenese	3
I.3.1	Initiation und Promotion	3
I.3.2	Tumorprogression	4
I.3.3	Die Adenom-Karzinom-Sequenz	4
I.3.4	Das Tumorprogressionsmodell	5
I.3.5	Metastasierung	6
I.4	Proto-Onkogene	7
I.4.1	Mechanismen der Onkogenentstehung	8
I.4.2	Mit dem Dickdarmkarzinom assoziierte Gen- alterationen	8
I.4.3	Das <i>k-ras</i> -Gen	9
I.4.4	Struktur des <i>k-ras</i> -Gens	9
I.4.5	Struktur und Funktion der <i>ras</i> -Proteine	10
I.5	Zelladhäsionsmoleküle	13
I.5.1	Cadherine	15
I.5.2	Struktur der Cadherine	16
I.5.3	Funktion der Cadherine	17
I.5.4	E-Cadherin	17
I.5.5	Das E-Cadherin-Gen	18
I.6	Ziele der Arbeit	19

	<b>Seite</b>
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
II.1 Material	20
II.1.1 Reagentien und Chemikalien	20
II.1.2 Oligonukleotide	25
II.1.3 Biologisches Material	26
II.2 Methodik	26
II.2.1 Probensammlung	26
II.2.2 HE-Färbung	26
II.2.3 Mikroskopie	27
II.2.4 DNA-Isolation	28
II.2.5 Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
II.2.5.1 Die Vermehrung der DNA-Fragmente	30
II.2.6 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	32
II.2.6.1 Die Funktion von Restriktionsenzymen	32
II.2.7 Prinzip der Two-Step-RFLP-Analyse von <i>k-ras</i>	33
II.2.8 Durchführung der PCR	35
II.2.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
II.2.9.1 Aufbau der Gießkammer	36
II.2.9.2 Elektrophorese	36
II.2.9.3 Färbevorgang	36
II.2.10 Aufreinigung der DNA	37
II.2.11 Verdauung mit <i>Bst</i> N I	37
II.2.12 Photodokumentation	37
II.2.13 DNA-Isolation E-Cadherin	40
II.2.14 Photometrie	41
II.2.15 Anfertigung von Standardlösungen	41
II.2.16 Durchführung der PCR	41
II.2.17 Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)	42
II.2.18 Durchführung der SSCP	44
II.2.19 Silberfärbung	44
II.2.20 Photodokumentation	44

	<b>Seite</b>
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>46</b>
III.1 k-ras	46
III.1.1 Patientengut	46
III.1.2 Auswertung der Ergebnisse	47
III.1.3 Statistische Auswertung	47
III.1.2 Kolorektale Adenome	49
III.1.2.1 Korrelation der Ergebnisse von sporadischen kolorektalen Adenomen mit den histologischen Befunden	50
III.1.3 Kolorektale Karzinome	51
III.1.3.1 Korrelation der Daten sporadischer kolorektaler Karzinome mit klinischen und histopathologischen Prognosefaktoren	52
III.1.3.2 Aufgliederung der Mutationsfrequenz nach Tumorlokalisation	54
III.1.3.3 Aufgliederung der Mutationsfrequenz nach dem Geschlecht der Patienten	54
III.1.4 Metastasen kolorektaler Karzinome	55
III.1.5 Entzündliche Gewebeproben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	56
III.1.6 Normalgewebeproben	57
III.2 E-Cadherin	58
III.2.1 Patientengut	58
III.2.2 Untersuchungsumfang	58
III.2.3 Auswahl der Untersuchungsbedingungen	58
III.2.4 Einschlußkriterien	58
III.2.5 Auswertung	60

	<b>Seite</b>
<b>IV. Diskussion</b>	<b>61</b>
IV.1 <i>k-ras</i>	61
IV.1.1 Auswahl des Materials und Erörterung der Methodik	61
IV.1.2 Sensitivität der Methode	61
IV.1.3 Fehlermöglichkeiten der Methodik oder bei der Interpretation	62
IV.1.4 Sporadische kolorektale Adenome und Karzinome	64
IV.1.4.1 Mutationsfrequenz	64
IV.1.4.2 Tumorstadium	65
IV.1.4.3 Entwicklung des <i>ras</i> -Status im Laufe des Tumorprogresses	65
IV.1.4.4 Mutationsverhalten des individuellen Tumors	67
IV.1.4.5 Positionsspezifität von Mutationen	68
IV.1.4.6 Prognosefaktoren	69
IV.1.4.7 Überlebenszeit	70
IV.1.4.8 Ansprechen auf eine Chemotherapie	70
IV.1.5 <i>K-ras</i> -Mutationen in histologisch normaler Mukosa	72
IV.1.5.1 Das Phänomen der „field cancerisation“	73
IV.1.6 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	76
IV.1.7 Familiäre Adenomatöse Polyposis	79
<b>IV.2 E-Cadherin</b>	<b>80</b>
IV.2.1 Diskussion der Methode	80
IV.2.2 Diskussion der Ergebnisse	81
<b>V. Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>

## Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
Bst N1	Restriktionsenzym
CAM	Cell Adhesion Molecules; Zelladhäsionsmoleküle
CDH1	E-Cadherin-Gen
CEDE	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRC	Kolorektale Karzinome
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E <sub>260</sub>	Extinktion bei 260 nm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
KATO III	Zelllinie mit bekannter E-Cadherin-Mutation an Exon 7
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
min	Minute
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
mM	Millimolar
P21	Proteinprodukt der <i>ras</i> -Gene
PAA	Polyacrylamid
PAG	Polyacrylamidgel
PCR	Polymerase Chain Reaction
ras	“rat sarcoma virus“-Onkogen
RER+	Replication error positive

RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rpm	rounds per minute
RPMI	Zellkulturmedium („Rosswell Park Memorial Institute“)
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SSCP	single-strand conformation polymorphism
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borat/EDTA
TGF- $\alpha$	Transforming growth Factor $\alpha$
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin

## **I. Einleitung**

### **I.1 Epidemiologie**

Das kolorektale Karzinom ist die dritthäufigste Krebserkrankung sowohl bei Männern (hinter Bronchial- und Magenkarzinomen) als auch bei Frauen (nach den Mamma- und Zervixkarzinomen) (BOYLE, 1997). Die Inzidenz beträgt 30/100.000 Einwohner mit steigender Tendenz. Der Erkrankungsgipfel befindet sich jenseits des 50. Lebensjahres, bei familiärer Belastung 10-20 Jahre früher. Es ist in den westlichen Industrienationen wesentlich häufiger als in Afrika, Südamerika und Asien.

Die häufigste Lokalisation des kolorektalen Karzinoms befindet sich im Rektum (60%), gefolgt von Karzinomen in Sigmakolon (20%) und im Zökum/Kolon ascendens (10%). Auf das restliche Kolon fallen 10% der Karzinome. Die Häufigkeit der Tumoren im rechten Hemikolon ist zunehmend („shift nach rechts“) (SLATER *et al.*, 1984, BEART *et al.*, 1983). In 5% der Fälle ist ein multizentrisches Vorkommen beschrieben (ARENAS *et al.*, 1997).

### **I.2 Ätiologie der Tumorentwicklung**

Verschiedenste Faktoren werden für die Entstehung kolorektaler Karzinome verantwortlich gemacht. Bereits 1928 postulierte K.H. BAUER in seiner „Mutationstheorie der Geschwulstentstehung“ die Verursachung genetischer Veränderungen in normalen Körperzellen durch das Zusammenwirken endogener und exogener Faktoren.

Heute werden etwa 90% der kolorektalen Karzinome auf exogene Faktoren zurückgeführt. So spielt die Ernährung eine Rolle: Migrationsstudien zeigen, dass sich die Inzidenz kolorektaler Karzinome innerhalb von zwei

Generationen an jene der neuen Heimat angleicht (HAENZEL, 1961). Fettreiche (HILL *et al.*, 1971), ballaststoffarme Kost (BURKITT, 1962) mit hohem Fleischanteil ebenso wie Übergewicht und Bewegungsarmut gelten als Risikofaktoren. Neben diätetischen Faktoren sollen auch die bakterielle Kolonflora sowie die Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit eine Rolle spielen (REDDY *et al.*, 1992). Auch langjähriges Zigarettenrauchen und Alkoholkonsum werden mit einer erhöhten Inzidenz kolorektaler Neoplasien gesehen, an Chemikalien finden Nitrosamine und Asbest Erwähnung. Protektiv hingegen wirkt eine ballaststoffreiche Nahrung mit regelmäßiger Gemüsezufuhr, eine schnelle Stuhlpassage, Vitamin C und Acetylsalicylsäure.

An Risikoerkrankungen werden Vorschädigungen des Darmes beschrieben wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen (insbesondere langjährig bestehende Colitis ulcerosa), Zustand nach Uretero-sigmoideostomie und Schistosomiasis, aber auch vorangegangene Karzinome von Mamma, Ovar und Corpus uteri.

Genetische Faktoren können bei 10% aller aufgetretenen Karzinome eruiert werden. In diese Gruppe gehören Patienten mit erkrankten Verwandten ersten Grades, familiärer Polyposis coli (FAP), hereditärem, nichtpolypösen Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) = Lynch-Syndrom, Gardner-Syndrom und Peutz-Jäger-Syndrom.

Molekulare Ursachen des HNPCC-Syndroms sind Keimbahnmutationen in sogenannten Mismatch-Repairgenen. Bislang sind sechs verschiedene Gene charakterisiert: hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6 (entspricht dem GT-bindenden Protein = GTBP), hPMS1 und hPMS2. Weitaus am häufigsten finden sich in HNPCC-Familien Mutationen in hMLH1 und hMSH2. Deren Expressionsverlust kann immunhistologisch dargestellt werden. Bei ca. 90% der HNPCC-assoziierten Karzinome finden sich Mikrosatelliteninstabilitäten (MIN) (PELTOMÄKI *et al.*, 1993), die bei sporadischen Karzinomen nur in ca. 15% nachweisbar sind (SENBA *et al.*, 1998).

Zur Identifikation des HNPCC-Syndroms wurden 1991 die „Amsterdam-Kriterien“ eingeführt. Ein HNPCC-Syndrom wird postuliert, wenn 1. drei Familienangehörige an einem kolorektalen Karzinom erkrankt sind, einer davon erstgradig verwandt; 2. zwei Generationen hintereinander betroffen sind; 3. ein Betroffener jünger oder gleich 50 Jahre alt ist.

Das für die FAP verantwortliche Gen wurde auf das Chromosom 5q21-22 lokalisiert (BODMER *et al.*, 1987). 1991 isolierten GRODEN *et al.* das APC-Gen aus diesem Bereich. Auch das sporadische kolorektale Karzinom weist bei über 60% der Betroffenen Mutationen des APC-Gens auf, wobei diese Mutationen in 50% der Fälle in einer engen Genregion detektiert wurden (SU *et al.*, 1993, GRODEN *et al.*, 1991, POWELL *et al.*, 1992). Patienten mit kolorektalen Karzinomen, die Mutationen und Allelverluste im APC-Gen aufweisen, scheinen im Gegensatz zu den Tumoren mit MSI eine schlechtere Prognose zu haben (BUBB *et al.*, 1996).

### I.3 Tumorigenese

Die Entstehung eines Tumors beruht auf einer Vielzahl genetischer Veränderungen, die im Verlauf eines komplexen „multistep“-Prozesses akkumulieren (FOULDS, 1958, NOWELL, 1976). Sie wird als ein Ungleichgewicht aus positiven und negativen Invasionsregulatoren betrachtet (LIOTTA *et al.*, 1991). Es lassen sich zumindest **drei** verschiedene **Stufen der Tumorigenese** unterscheiden: die **Initiation**, **Promotion** und anschließende **Progression** (FARBER *et al.*, 1980, HECKER *et al.*, 1982). Jede Stufe in diesem Prozeß präsentiert eine physiologische Barriere, die für einen weiteren Progress der Zelle in Richtung Malignität durchbrochen werden muß (WEINBERG, 1989). Ihr entgegen stehen systemische und zellspezifische Mechanismen, die eine Komplettierung der Tumorigenese verhindern sollen.

### **I.3.1 Initiation und Promotion**

Die Folgen der Tumorigenese auf zellulärer Ebene bestehen unter anderem in der Immortalisierung der Zelle, dem Verlust der Kontaktinhibition, der Dedifferenzierung und der Fähigkeit zu invasivem Wachstum. Diese erste Phase der Tumorigenese, die mit der Immortalisierung der Zelle einhergeht, wird als „Initiierung“ bezeichnet.

Immortalisierte Zellen erscheinen phänotypisch normal, aber replizieren sich endlos in einer Kultur, während transformierte Zellen die morphologischen Kriterien für Malignität erfüllen. Dieser zweite Schritt wird unter dem Begriff der „Promotion“ zusammengefasst. In den meisten Fällen müssen zwei Onkogene kooperieren, um einen kompletten malignen Phänotyp in Zellen zu erzeugen (LAND *et al.*, 1983).

### **I.3.2 Tumorprogression**

Das entstehende Tumorgewebe selbst muß sich einerseits dem Einfluß des Immunsystems entziehen können, andererseits muß dessen Versorgung mit Nährstoffen durch (auto-) tumorinduzierte Neoangiogenese sichergestellt werden (FOLKMAN, 1985). Der Begriff des Tumors bezeichnet die abnorme Vergrößerung von Geweben durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen.

### **I.3.3 Die Adenom-Karzinom-Sequenz**

Diese verschiedenen Schritte der Tumorigenese haben morphologische Veränderungen im Zellverband zur Folge.

Die meisten (95%) aller kolorektalen Karzinome entstehen auf dem Boden eines Adenoms (HILL *et al.*, 1978). Bei lange bestehender Colitis ulcerosa hingegen sind Karzinomentwicklungen auch direkt aus schweren Epitheldysplasien beschrieben.

### I.3.4 Das Tumorprogressionsmodell

FEARON und VOGELSTEIN (1990) ordneten diesen morphologischen Veränderungen bestimmte Ereignisse in der „Multistep“-Tumorigenese zu und erstellten daraus das Tumorprogressions-Modell. Hiernach stellt die Entwicklung eines Karzinoms über die Vorstufe des Adenoms eine Summation verschiedener genetischer Alterationen dar, die in ihrer Gesamtzahl zu einem unkontrollierten malignen Wachstum führen.

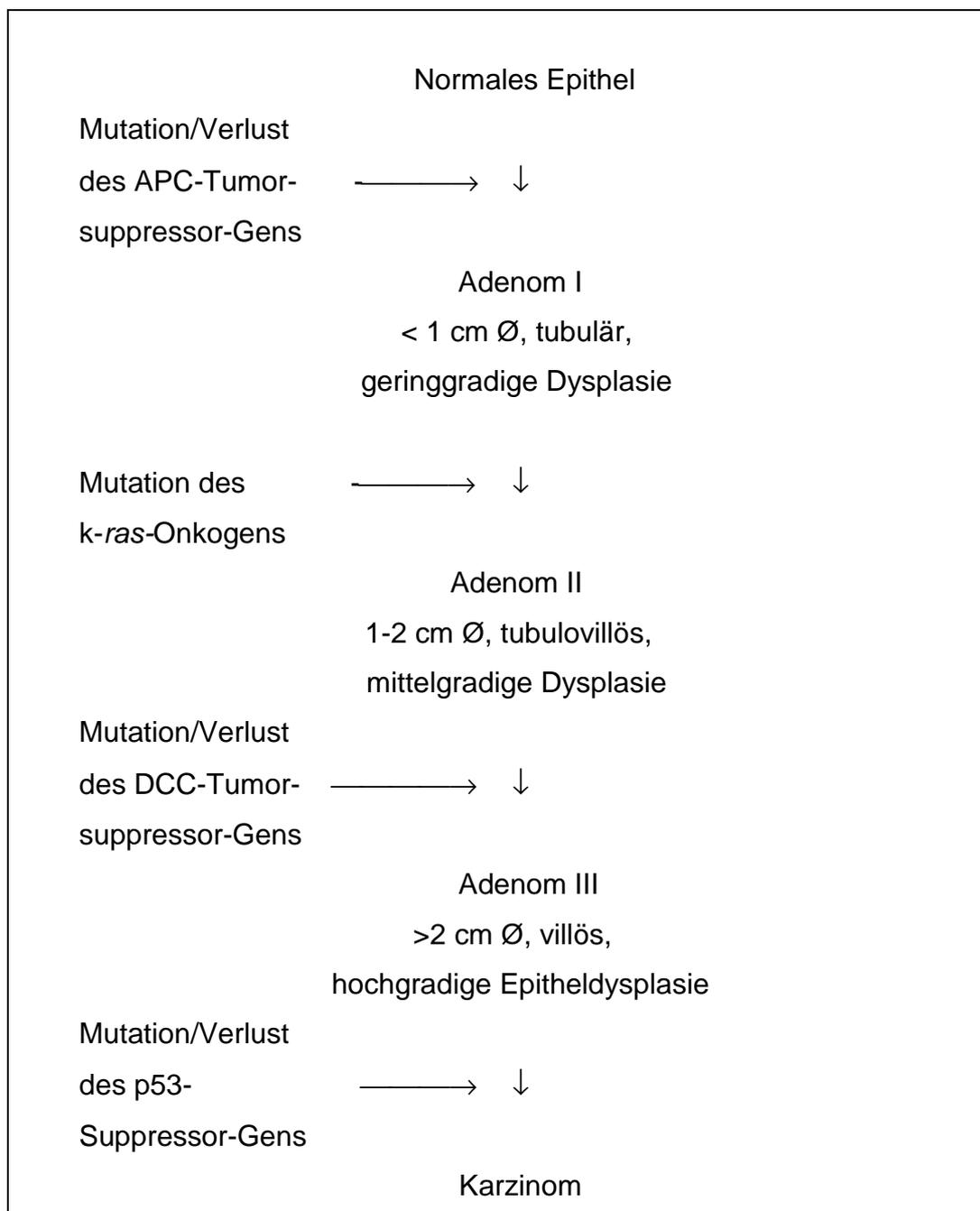


Abb. 1: Tumorprogressionsmodell nach FEARON und VOGELSTEIN (1990).

### I.3.5 Metastasierung

Der Prozeß der Metastasierung scheint durch eine Vielzahl verschiedener Genprodukte verursacht zu werden. Hierzu zählen Zell-Zell- und Zell-Matrix Rezeptoren (BERNSTEIN *et al.*, 1994, JULIANO *et al.*, 1993); proteolytische Enzyme, die die Auflösung des Zellverbandes und die Invasion in die Basalmembran, das Gefäßsystem und in Organe vereinfachen (ELLIS *et al.*, 1992, LIOTTA, 1992, MATRISIAN, 1992); Motilitätsfaktoren, die die Migration durch das Gewebe ermöglichen (STOKER *et al.*, 1991, VAN ROY *et al.*, 1992); Rezeptoren, die eine organspezifische Invasion erlauben (NICHOLSON, 1991); Wachstumsfaktoren, die u.a. die Tumormikrokolonien aufrechterhalten (BASERGA, 1994) sowie Angiogenesefaktoren, die in einer Neovaskularisation der Metastasen resultieren und so die Versorgung mit Nährstoffen, die Entfernung von Metaboliten und die hämatogene Metastasierung der Zellen sicherstellen (FOLKMAN, 1995, LIOTTA *et al.*, 1991).

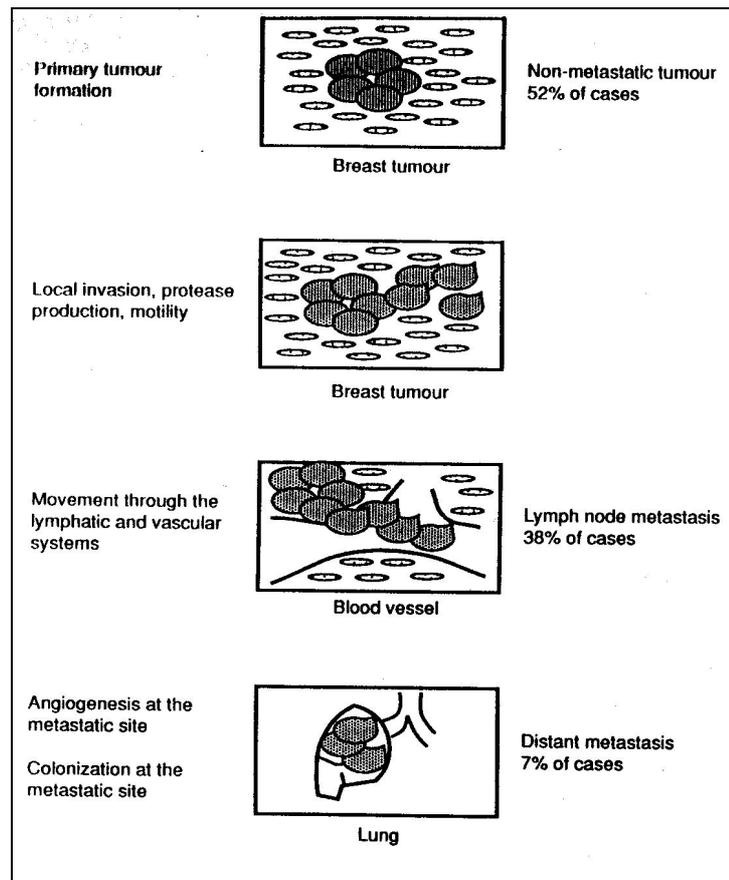


Abb. 2: nach MACDONALD (1993): Schematische Darstellung der Tumormetastasierung am Beispiel des Mammakarzinoms unter Berücksichtigung der hauptsächlichsten phänotypischen Veränderungen, die zur Tumormetastasierung führen.

## I. 4 Proto-Onkogene

Der physiologische Ablauf der Zellvermehrung, des Zellwachstums und der Differenzierung und die damit verbundene positive Regulation der Zellabläufe wird durch sogenannte Protoonkogene oder c-Onkogene gesteuert (WEINBERG, 1985, BISHOP, 1985), die die nicht mutierten, konstitutiven Gene darstellen. In genetisch veränderter, aktivierter Form erhalten diese Gene die Bezeichnung „Onkogen“ (BISHOP, 1987, PIMENTEL 1989).

Unter den zur Zeit etwa 60 verschiedenen bekannten Protoonkogenen mit ihren korrespondierenden Onko-Proteinen lassen sich aufgrund der unterschiedlichen zellulären Lokalisation, Funktion und Struktur der Onko-Proteine vier verschiedene Proto-Onkogenklassen unterscheiden (BISHOP, 1991):

1. **Wachstumsfaktoren:** Peptidhormone, die ausgelöst durch intrazelluläre Ereignisse an Rezeptoren binden und hierdurch auf die DNA-Replikation und Zellproliferation wirken, wie z.B. der „epidermal growth factor“ (EGF), der „transforming growth factor“ (TGF) und der „platelet derived growth factor“ (PDGF).
2. **Wachstumsfaktor-Rezeptoren:** Proteinkinasen, die die Phosphat-Gruppen von ATP auf Tyrosin-, Serin- oder Threonin-Seitenketten übertragen, wie z.B. der „epidermal growth factor receptor“ (EGF-R), das „HER-2/neu“-Protein und der „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGF-R).
3. **GTP-bindende Proteine:** Proteine, die an der Übertragung extrazellulärer Signale über die Zellmembran ins Zellinnere beteiligt sind, wie z.B. die „ras-Familie“.
4. **Zellkernproteine:** Proteine, die als Regulatoren der DNA-Replikation und Expression wirken, wie z.B. „c-myc“, „jun“ und „fos“.

### I.4.1 Mechanismen der Onkogenentstehung

Folgende Mechanismen sind zur Umwandlung von Proto-Onkogenen in Onkogene bekannt:

1. **Punktmutation** (Basenaustausch in der proteinkodierenden Sequenz)
2. **Gen-Amplifikation** (Erhöhung der Genkopienzahl)
3. **Chromosomen-Translokation** (Verlagerung eines Chromosomenabschnittes auf ein anderes Chromosom)

Diese Mechanismen ziehen regulatorische oder strukturelle Veränderungen der zellulären Proto-Onkogene nach sich, die zum Verlust der Zellwachstumskontrolle führen können. Für eine aktivierende Mutation der *ras*-Gene sind einzelne Punktmutationen ausreichend.

### I.4.2 Mit dem Dickdarmkarzinom assoziierte Genalterationen

Mittlerweile sind eine ganze Reihe verschiedener molekularer Veränderungen in kolorektalen Karzinomen nachgewiesen worden. Die folgende Tabelle gibt hierzu einen Überblick:

Gen	Locus	Länge (AS <sup>a</sup> bzw. kB <sup>b</sup> )	Exons
<b>Onkogene</b>			
k-ras (Kirsten rat sarcoma virus)	12p12.1	189 AS	5
c-src (Rous sarcoma virus)	20q13	536 AS	12
c-myc (Myelocytomatosis virus)	8q24ter	10 kB	3
<b>Tumorsuppressorgene</b>			
APC-Gen	5q21-22	2843 AS	15
p53-Gen	17p13	393 AS	11
MCC-Gen	5q21.2	829 AS	?
DCC-Gen	18q21.2	1447 AS	29
<b>Mismatch-Repair-Gene</b>			
hMSH2	2p16	1037 AS	16
hMLH1	3p21	756 AS	19
hPMS1	2q31-33	932 AS	
hPMS2	7q22	862 AS	
GTBP (hMSH6)			

<sup>a</sup> Aminosäuren, <sup>b</sup> Kilobasen

Tab.1: (nach KARNER-HANUSCH et al., 1999) Mit dem Dickdarmkarzinom assoziierte Genalterationen

### **I.4.3 Das *k-ras*-Gen**

Die *ras*-Gene wurden zuerst als die transformierenden Gene der Harvey- und Kirsten-Stämme von MuSV (Harvey- und Kirsten murine sarcoma virus) charakterisiert (ELLIS *et al.*, 1981). Diese viralen Gene (*v-onc*) besitzen eine beträchtliche Nukleotidhomologie und kodieren für ein strukturell verwandtes Protein mit einem Molekulargewicht von 21.000.

Durch Transfektionsversuche an NIH 3T3, einer Maus-Fibroblasten-Zelllinie, konnten transformierende Gene in verschiedensten malignen Tumoren identifiziert werden (MURRAY *et al.*, LANE *et al.*, PERUCHO *et al.*, alle 1981; PULCIANI *et al.*, 1982). Klarer wurden diese Entdeckungen durch die Erkenntnis, daß viele dieser Gene zelluläre Homologe viraler Onkogene repräsentieren (DER, *et al.*, PARADA, *et al.*, SANTOS, *et al.*, alle 1982; SHIMIZU *et al.*, 1983, BISHOP, 1983). Die Beteiligung der *ras*-Oncogene an der Kanzerogenese wurde erstmals postuliert.

Man differenziert drei aktive Gene und einige Pseudogene; wobei die aktiven Gene die Namen K (oder Ki-, Kirsten)-, H (Harvey)- und N-*ras* erhielten. Aufgrund der ihnen gemeinsamen molaren Masse von ca. 21000 Da werden ihre Proteinprodukte unter dem Begriff p21<sup>ras</sup> zusammengefaßt (ELLIS *et al.*, 1981).

### **I.4.4 Struktur des *k-ras*-Gens**

Der Aufbau der drei Gene zeichnet sich durch stark verwandte Strukturen aus. Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal des K-*ras*-Genes stellt der Besitz eines zusätzlichen Exons dar, wodurch mittels alternativen Spleißens verschiedene Proteine ausgebildet werden können (MCGRATH *et al.*, 1983). Auch die unterschiedlichen Proteinprodukte selbst weisen eine ähnliche Morphologie auf und gleichen den  $\alpha$ -Untereinheiten der G-Proteine sowie der  $\beta$ -Untereinheit der mitochondrialen und bakteriellen ATP-Synthase (GAY *et al.*, 1983).

### I.3.6. Die Struktur und Funktion der *ras*-Proteine

Die *ras*-Proteine sind Polypeptidketten aus 188 oder 189 Aminosäuren, die mit Hilfe von Palmitinsäure an die innere Plasmamembran gebunden sind (WILLINGHAM *et al.*, 1980, SHIH *et al.*, 1982).

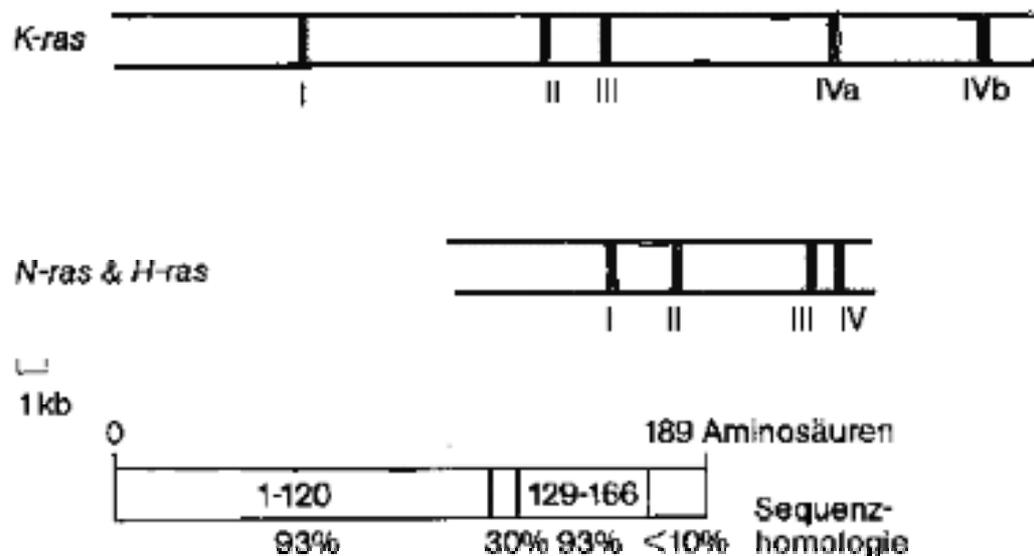


Abb.3: (nach LEWIN: *Gene*, 1991). Die menschliche *ras*-Genfamilie hat drei Mitglieder mit eng verwandter Struktur. *N-ras* und *H-ras* besitzen fünf Exons. Das erste Exon codiert keine Aminosäuresequenz, die Exons I-IV kodieren das Protein. *K-ras* ist wesentlich größer und hat ein zusätzliches alternatives viertes codierendes Exon (IVb). Die drei *ras*-Proteine weichen nur in relativ begrenzten Regionen voneinander ab.

Sie besitzen GTP-bindende Eigenschaften (SCOLNICK *et al.*, 1979) und verfügen selbst über eine schwache GTPase-Aktivität (MCGRATH *et al.*, 1984). Damit sind sie in der Lage, mittels Hydrolyse vom aktivierten, GTP-gebundenen Zustand in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand zurückzukehren (FEIG, 1993). Dieser Vorgang wird durch ein zytoplasmatisches Protein mit der Bezeichnung GAP (GTPase activating protein) stimuliert (TRAHEY, 1987), das die normale *ras*-Funktion inhibiert (McCORMICK, 1989).

Wenn ein Wachstumsfaktor an seinen Rezeptor bindet, wird dieser physiologischerweise vorübergehend aktiviert. Diese Aktivierung verursacht wiederum die Aktivierung weiterer Proteine in der Wachstumsstimulationskaskade sowie die Produktion einer Vielzahl kleiner

Regulationsmoleküle, die als „second messenger“ bezeichnet werden. Diese Signale werden an den Zellkern weitergeleitet, wo die Expression spezifischer Gene induziert wird, die in der Zellteilung resultieren. In diesen Prozeß sind wachstumshemmende Signale eingeschaltet, um eine endlose Zellteilung zu verhindern.

Die *ras*-Proteine werden durch Rezeptoren aktiviert, die der Tyrosinkinase-Familie angehören (HAGAG *et al.*, 1986). Aktiviertes *ras* erhält eine Konformationsänderung und setzt eine Phosphorylierungskaskade über drei Proteinkinasen in Gang. Die letzte Kinase in dieser Reihe phosphoryliert verschiedene Zielproteine, unter anderem auch Genregulatorproteine, die eine Änderung der Genexpression bewirken und zur Zellproliferation und Zelldifferenzierung führen (McCORMICK, 1994).

Es hat sich gezeigt, daß nahezu alle Protooncogene eine physiologische Rolle im Rahmen der Entwicklung zu spielen scheinen und werden dann - allerdings in geringer Menge - transkribiert (MÜLLER *et al.*, 1982). Alle Mutationen, die die Fähigkeit zur Transformation erwecken, führen zu einer Inaktivierung der GTPase-Wirkung und damit zu einem dauerhaften Aktivitätszustand des Proteins.

DAWSON *et al.* (1995) beschrieben, daß eine Funktion der *ras*-Gene in der Induktion von IGF 1 bestehen könnte. Sie konnten einen etwa 30fachen Anstieg der IGF-1 Produktionsrate durch mutiertes p21*ras* in den betroffenen Zellen nachweisen. Auch andere Wachstumsfaktoren scheinen durch die *ras*-Proteine aktiviert zu werden.

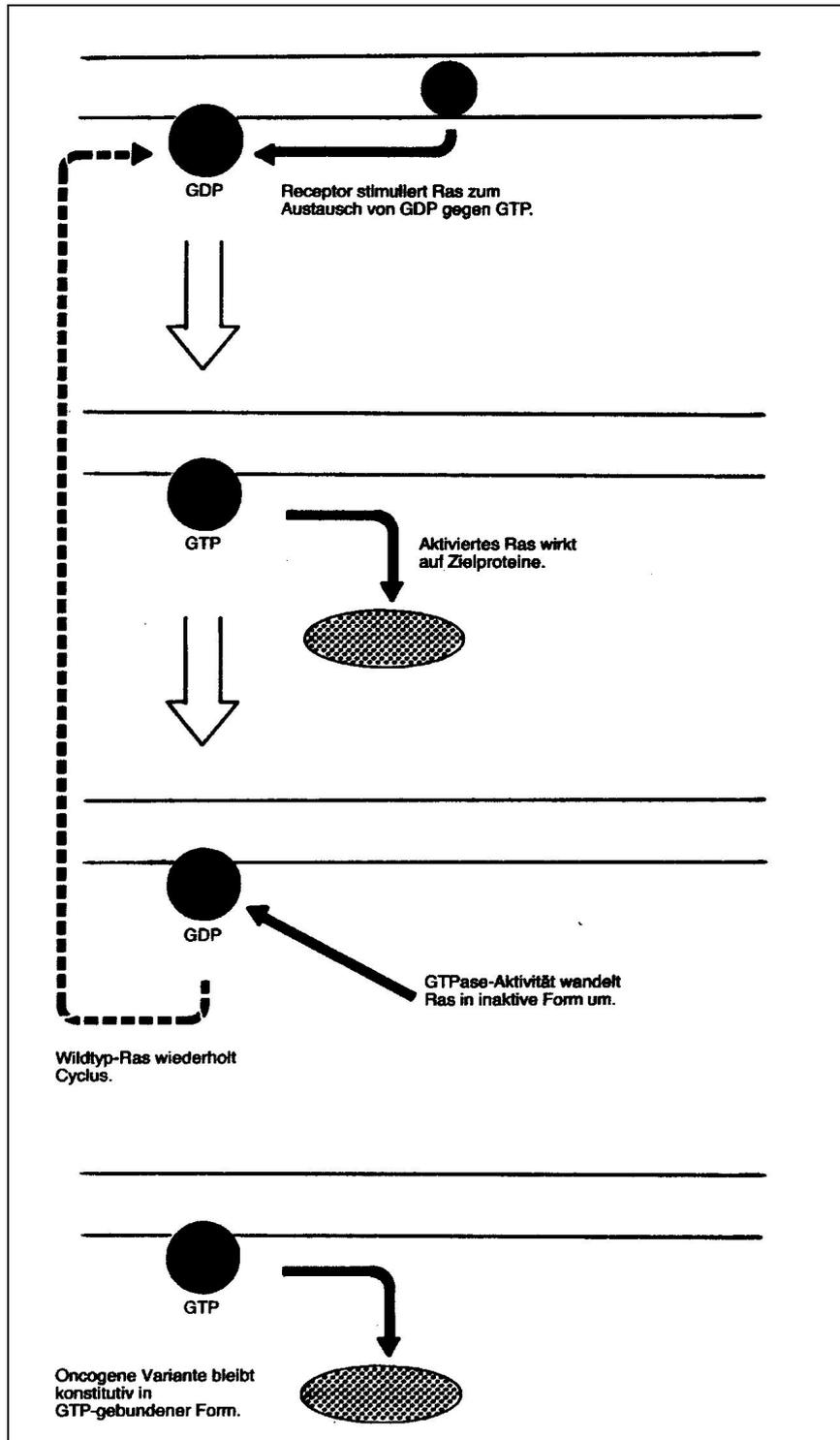


Abb 4: (nach LEWIN: Gene, 1991). Die Aktivierung von Ras stimuliert den Austausch seines GDP gegen GTP. Das aktive Protein erkennt seinen Effektor. Anschließend wird GTP zu GDP gespalten, und das Ras-Protein wird inaktiv. Wildtyp-Ras bewegt sich also in einem Kreislauf zwischen inaktiver (GDP-gebundenen) und aktiver (GTP-gebundenen) Form. Transformierende Ras-Mutanten hydrolysieren GTP nicht und bleiben daher in der aktiven, GTP-gebundenen Form.

## I.5 Zell-Adhäsionsmoleküle

Ein menschlicher Organismus besteht aus hunderten verschiedener Zelltypen. Die verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Gewebes sind meist in präzisen, komplexen Mustern arrangiert. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei Zellkontakte, die durch verschiedene integrale Membranproteine, die sogenannten Zell-Adhäsionsmoleküle (CAMs), ermöglicht werden.

Zusätzlich wird durch die Zellen ein komplexes Netzwerk an Proteinen und Kohlenhydraten sezerniert, das ein spezielles Milieu in den Zellzwischenräumen schafft. Diese sogenannte extrazelluläre Matrix hilft bei der Zellbindung und stellt ein Reservoir für viele das Zellwachstum und die Differenzierung beeinflussende Hormone dar. Defekte in diesen Verbindungen führen zu Krebs und Entwicklungsfehlbildungen.

Im Anschluß an die Zellaggregation, die durch Zelladhäsionsmoleküle ausgelöst wird, entwickeln Zellen spezialisierte Zellverbindungen (junctions). Diese stabilisieren die Adhäsion und fördern lokale Kommunikation zwischen den benachbarten Zellen (z.B. Erregungsausbreitung an Nervenzellen oder Austausch kleiner Moleküle durch Gap-junctions).

Diese spezialisierten Verbindungen bestehen aus einer Ansammlung von Zelladhäsionsmolekülen und sind essentiell für eine adäquate Zellfunktion. Es existieren vier Hauptgruppen dieser Junctions: die tight-junctions, gap-junctions, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen.

Cadherin-haltige Verbindungen sind Desmosomen und Adhärenzverbindungen (BOLLER *et al.*, 1985). Häufig bilden Adhärenzverbindungen einen durchgängigen Adhäsionsgürtel um jede der beteiligten Epithelzellen. Durch die Aneinanderheftung der benachbarten Zellmembranen bewirken sie Stärke und Rigidität des gesamten Gewebes und erhalten über die durchgehende Verbindung der Aktinbündel die Möglichkeit, das Epithel zu

verbiegen (z.B. bei der Ausbildung des Neuralrohres während der embryonalen Entwicklung).

Trotz ihrer Komplexität sind alle Zytoskelett-assoziierten Verbindungen in drei Anteile strukturiert: die Zelladhäsionsmoleküle, Adapterproteine, die die CAMs an Aktin- oder Keratinfilamente binden, und die Zytoskelettfilamente selbst (HIRANO *et al.*, 1987).

Es sind fünf große Klassen von CAMs bekannt: Cadherine, die Immunglobulin (Ig) Superfamilie, Selektine, Muzine und Integrine.

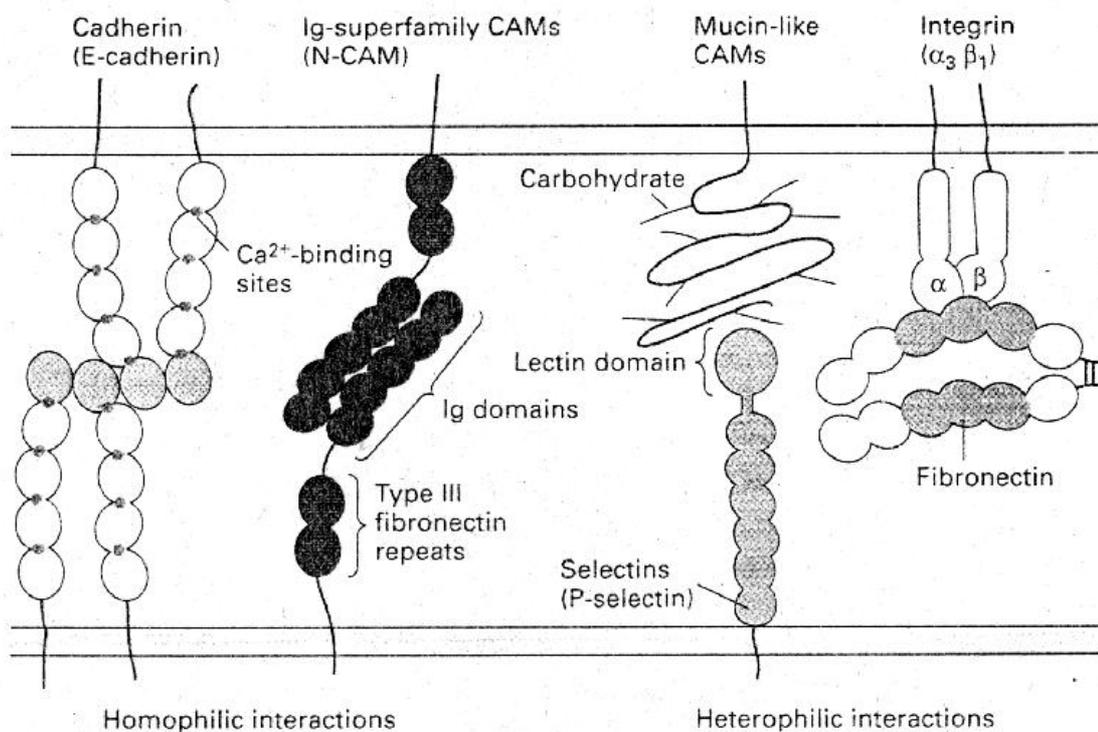


Abb.5: Die häufigsten Familien von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) (nach: LODISH, Mol. cell biology, 1999): Integrale Membranproteine werden aus multiplen Domänen gebildet. Cadherine und die Ig Superfamilie vermitteln homophile Zelladhäsion. Für Cadherin sind die Calciumbindungsstellen zwischen den fünf Domänen im extrazellulären Segment notwendig für die Zelladhäsion; die N-terminale Domäne des Cadherins verursacht die Dimerisierung sowie die Bindung der Cadherin-Dimere der gegenüberliegenden Membran. Die Ig Superfamilie enthält multiple Domänen, die in ihrer Struktur Ähnlichkeit mit den Immunglobulinen aufweisen und häufig Fibronectin Typ III repeats enthalten. Durch heterophile Interaktion bindet die Lektindomäne über Kohlenhydratketten muzinartiger CAMs an die anhängenden Zellen in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Lectin-Domäne wird von der Membran durch eine Reihe wiederholter Domänen getrennt. Das häufigste Zell-Matrix-Adhäsionsmolekül, Integrin, ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Es bindet an die Zellbindungsdomäne von Fibronectin, Laminin oder anderen Matrixmolekülen.

### I.5.1 Cadherine

Cadherine sind eine Familie von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren, die bei Vertebraten vorkommen (TAKEICHI, 1988). Die ersten drei entdeckten Cadherine wurden nach den Geweben benannt, in denen sie hauptsächlich auftraten: E-Cadherin kommt in vielen Epithelien vor, N-Cadherin in Nerven-, Muskel- und Linsenzellen, und P-Cadherin wurde in Placenta- und Epithelzellen gefunden (GALLIN *et al.*, 1987, NAGAFUCHI *et al.*, 1987, NOSE *et al.*, 1987, RINGWALD *et al.*, 1987, HATTA *et al.*, 1988). Sie alle werden auch zwischenzeitlich in verschiedenen anderen Geweben während der Entwicklung nachgewiesen. Es werden kontinuierlich weitere Cadherine entdeckt, mittlerweile sind über ein Dutzend von ihnen bekannt. Es scheint, als ob jede Wirbeltierzelle ein oder mehrere Cadherine exprimiert, die jeweils durch ein separates Gen codiert werden. Zumindest exprimieren alle Zelltypen, die solides Gewebe formieren, einige Mitglieder dieser molekularen Familie.

*Die häufigsten Cadherin-Moleküle in Säugetierzellen:*

<u>Molekül</u>	<u>hauptsächliche Zellverteilung</u>
E-Cadherin	präimplantierte Embryos, nichtneuronales Epithelgewebe
P-Cadherin	Trophoblast
N-Cadherin	Nervensystem, Linse, Herz- und Skelettmuskulatur

*Tab.2: nach : TAKEICHI 1988, 1991, INUZUKA et al. 1991, DONALIES et al. 1991*



### **I.5.3 Funktion der Cadherine**

Cadherine binden Zellen über homophile Interaktionen (d.h. gleiche Zellen werden miteinander dadurch verbunden, daß identische Moleküle sich aneinander koppeln). Dieses Phänomen wird als homophile Bindung bezeichnet (NOSE *et al.*, 1988). Cadherine spielen eine entscheidende Rolle bei der gegenseitigen Verbindung von Zellen. Blockiert man alle anderen Adhäsionsmoleküle außer den Cadherinen, so bleibt der Zellverband trotzdem bestehen. Sie scheinen verantwortlich für die Ausbildung von Junktionskomplexen, der Zellpolarisierung und Tumorinvasion (GUMBINER *et al.*, 1988) zu sein. Damit partizipieren sie in der Signalisierung und Kommunikation zwischen benachbarten Zellen (TAKEICHI, 1991).

Durch ihre homophilen Bindungsinteraktionen tragen sie zu Zellsortierungsmechanismen bei. Durch regulierte Expression der Cadherine wird außerdem die Zellpolarität und Gewebsmorphologie kontrolliert. Cadherine werden deshalb als wichtige Regulatoren der Morphogenese betrachtet (TAKEICHI, 1991). Pathologische Untersuchungen lassen vermuten, daß die Down-Regulation der Cadherin-Expression mit der Invasivität und Entdifferenzierung von Tumorzellen in Zusammenhang stehen (BIRCHMEIER *et al.*, 1994, MAREEL *et al.*, 1994, TAKEICHI, 1993, SHINO *et al.*, 1995, TAKAMURA *et al.*, 1996, HUNT *et al.*, 1997).

Sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede in der Expression von Cadherinen scheinen einen wichtigen Anteil in der Ausbildung von Gewebsverbänden zu bilden.

### **I.5.4 E-Cadherin**

E-Cadherin (auch Uvomorulin genannt) ist das am besten charakterisierte Cadherin. Es ist ein 120 kDa schweres Glycoprotein (TAKEICHI, 1991). E-Cadherin ist konzentriert in Adhäsionsgürteln reifer Epithelzellverbände nachweisbar. Diese interzellulären Adhäsionen werden über ein komplexes Haltesystem erreicht. Über sogenannte Adapterproteine, die aus Proteinen

der Catenin-Familie ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Catenine) bestehen (HERRENKNECHT *et al.*, 1991, MCCREA *et al.*, 1991, KNUDSEN *et al.*, 1992), ist E-Cadherin über seine zytoplasmatische Domäne mit den Aktin-Filamenten des Zytoskelettes verankert. Diejenigen, denen die zytoplasmatische Domäne fehlt, sind nicht in der Lage, den Zellverband zu erhalten.

E-Cadherin ist das erste Cadherin, das während der embryonalen Entwicklung von Säugetieren exprimiert wird.

### I.5.5 Das E-Cadherin-Gen

Das E-Cadherin-Gen wird auch mit der Abkürzung CDH1 bezeichnet. Es ist auf dem Chromosom 16q22.1 lokalisiert, besteht aus 16 Exons und erstreckt sich über eine Region von ungefähr 100 kb (BUSSEMAKERS *et al.*, 1993).

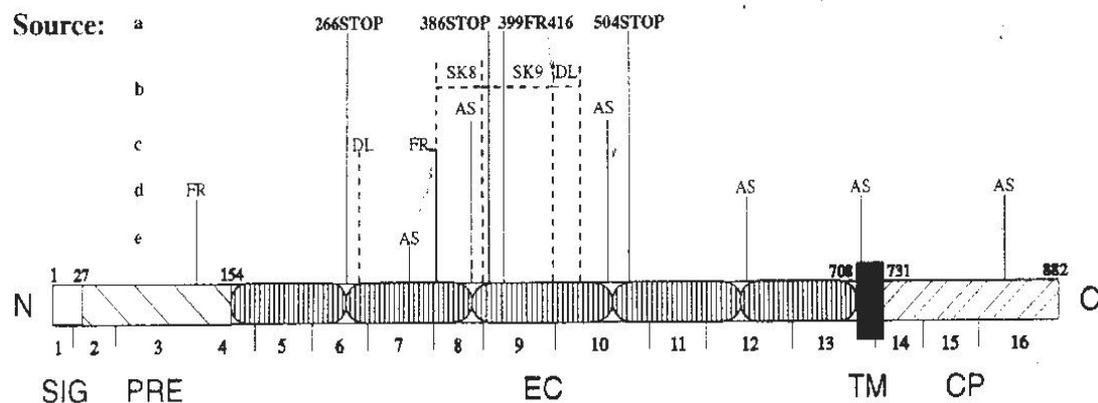


Abb. 7: nach BERX *et al.*, 1995: Schematische Darstellung der bisher für E-Cadherin beschriebenen, nicht stummen Mutationen. N, Amino-Terminus; C, Carboxyterminus; SIG, Signalpeptide; PRE, Precursor Sequenz; EC, Extrazelluläre Domäne mit Calciumbindungsstelle; TM, transmembranäre Domäne; CP, cytoplasmatische Domäne. Die Zahlen oberhalb des Proteins kennzeichnen die Codonnummerierung an den Domänengrenzen. Die Zahlen unterhalb des Proteins kennzeichnen die codierenden Exons. Zeile **a** faßt die von BERX beschriebenen Mutationen bei infiltrativen lobulären Mammakarzinomen zusammen. Andere Mutationen sind beschriftet als: AS, Aminosäuresubstitution; DL, Deletion; FR, Frameshift durch Deletion oder Insertion; SK Überspringen eines Exons. Sie umreißen Mutationen von Magenkarzinomen (Zeile **b**) (BECKER *et al.*, 1993, 1994), Magenkarzinomzelllinien (Zeile **c**) (ODA *et al.*, 1994), Endometrium- und Ovarialkarzinome (Zeile **d**) (RISINGER *et al.*, 1994) und Lobuläre Mammakarzinome (Zeile **e**) (KANAI *et al.*, 1994).

## **I.5 Ziele der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Probleme erörtert werden:

In zwei verschiedenen Ansätzen wurden zunächst Untersuchungen auf das Vorliegen von Mutationen des *k-ras*-Gens durchgeführt:

Untersucht wurden neoplastische Gewebeproben von Patienten mit den unterschiedlichen Grunderkrankungen: sporadische kolorektale Karzinome, Colitis ulcerosa und Polyposis coli. Unterschiede im Zeitpunkt und der Häufigkeit des Auftretens von Mutationen im Rahmen des Tumorprogresses sowie der einzelnen Krankheitsentitäten untereinander wurden betrachtet.

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist das Vorkommen von Malignomen unter Umgehung des Adenomstadiums über eine Dysplasie-Karzinomsequenz bekannt. Wir interessierten uns für das Auftreten von *k-ras*-Mutationen in entzündlichen und dysplastischen Gewebeproben.

An begrenztem Untersuchungsmaterial werden für Normalgewebeproben *k-ras*-Mutationen beschrieben, die als sog. field cancerisation eingeschätzt wurden. Dieses Phänomen sollte an einem größeren Untersuchungsgut überprüft werden.

In einem zweiten Untersuchungsansatz interessierten wir uns für das Vorkommen von Mutationen innerhalb des E-Cadherin-Gens. Für kolorektale Karzinome waren zum Untersuchungszeitpunkt nur Veränderungen der Expression von E-Cadherin bekannt. In einzelnen Studien konnten aber auch Mutationen bei Magen-, Mamma- und anderen gynäkologischen Tumoren nachgewiesen werden.

## II. Material und Methoden

### II.1 Material

Untersucht wurden Tumorgewebe, Metastasen und Normalgewebeproben von Personen mit sporadischen kolorektalen Adenomen und Karzinomen sowie von Patienten mit Polyposis coli und Colitis ulcerosa, die von September 1991 bis Februar 1996 in der chirurgischen Klinik A der Universitätsklinik Düsseldorf operiert wurden. Weiterhin wurden von letzteren ebenfalls entzündliche Gewebeproben untersucht. Die histologische Diagnose stammte vom dortigen pathologischen Institut.

#### II.1.1 Reagentien und Chemikalien

Es wurden, sofern nicht anders erwähnt oder gekennzeichnet, Reagentien im Reinheitsgrade „zur Analyse“ und bidestilliertes Wasser verwendet.

Acrylamid $\geq 99\%$	Sigma, Nr. A3553, St. Louis, USA
Agarose	Sigma, Nr. A9539, St. Louis, USA
Amberlite MB 1	Serva, Nr. 40701, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Sigma, Nr. A9164, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Merck, Nr. 159102, Darmstadt
BstNI	New England BioLabs, Nr. 1685, Beverly, USA
dATP	Sigma, Nr. D4788, St. Louis, USA
dCTP	Sigma, Nr. D7296, St. Louis, USA
dGTP	Sigma, Nr. D5038, St. Louis, USA
dTTP	Sigma, Nr. T9656, St. Louis, USA
Depex	Serva, Nr. 18243, Heidelberg
EDTA	Sigma, Nr. E5134, St. Louis, USA
Eisessig	Merck, Nr. 100047, Darmstadt
Eosin G	Merck, Nr. 15935, Darmstadt
Ethanol absolute GR	Merck, Nr. 100983, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Nr. E1510, St. Louis, USA
Formaldehyd	Merck, Nr. 104025, Darmstadt

Formamid	Merck, Nr. 109684, Darmstadt
Gelatine	Merck, Nr. 104078, Darmstadt
Gel Loading Solution	Sigma, Nr. G2526, St. Louis, USA
Glycerol 99+%	Sigma, Nr. G5516, St. Louis, USA
Hämalaun (nach Mayer)	Merck, Nr. 9249, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Nr. 109634, Darmstadt
KCl crystal. (Fractopur <sup>®</sup> )	Merck, Nr. 116101, Darmstadt
Laurylsulfat	Sigma, Nr. L3771, St. Louis, USA
MgCl <sub>2</sub> -Solution	Perkin Elmer, Nr. 55611, Norwalk, USA
Mineral Oil	Sigma, Nr. M5904, St. Louis, USA
Natriumcarbonat	Merck, Nr. 106392, Darmstadt
NaOH crystal. (Selectipur <sup>®</sup> )	Merck, Nr. 106497, Darmstadt
N,N'-Methyl-bis-Acrylamid	Sigma, Nr. M2022, St. Louis, USA
NE-Buffer II 10x Concentrate	BioLabs, Nr. P119C, Beverley, USA
Nuclease Free Water	Promega, Nr. P119C, Madison, USA
Phenol	Merck, Nr. 100206, Darmstadt
ΦX/A4/Hinf I	Stratagene, Nr. 201102, Heidelberg
PCR Buffer 10x Concentrate	Perkin Elmer, Nr. 55690, Norwalk, USA
PCR Buffer II 10x Concentrate	Perkin Elmer, Nr. 55693, Norwalk, USA
Proteinase K	Boehringer, Nr. 1000144, Mannheim
RPMI 1640	Biochrom, Nr. F1215, Berlin
Silbernitrat	Merck, Nr. 101512, Darmstadt
Silicone Solution (Isopropanol)	Serva, Nr. 35130, Heidelberg
Taq Polymerase	Perkin Elmer, Nr. N801-0060, Norwalk, USA
TBE-Buffer 5x Concentrate	Sigma, Nr. T6400, St. Louis, USA
Temed	Sigma, Nr. T7024, St. Louis, USA
Tissue-Tek <sup>®</sup>	Sakura/Miles, Nr: 4583, Torrance, USA
TRIS-HCl	Merck, Nr. 108219, Darmstadt
Trizma Base (Tris-HCl, pH 8,5)	Sigma, Nr. T8524, St. Louis, USA
Tween 20	Bio Rad, Nr. 170-6531, Richmond, USA
Xylencyanol	Merck, Nr. 110590, Darmstadt
Xylol	Merck, Nr. 8685, Darmstadt

**0,5%ige SDS-Lösung:**

Für eine 0,5%ige SDS-Lösung wurden 0,1 g Laurylsulfat in 20 ml Wasser aufgelöst.

**2 x DNA-Puffer:**

100 mM Trizma Base  
2 mM EDTA  
1% Tween-20

**filtriertes Mineralöl:**

Zur Herstellung wurde Mineralöl mit Hilfe einer sterilen Spritze durch ein Bakterienfilter gedrückt.

**Stammlösung für die PCR:**

- 1) 0,5 M KCl
- 2) 1 M Tris x HCl pH = 8,3
- 3) Gelatine, 0,5%ige Lösung
- 4) 1 M MgCl<sub>2</sub>
- 5) Primer: 50 pmol/μl

**Mastermix 10 x dNTP's:**

Jeweils 20 μl dATP, dCTP, dTTP und dGTP wurden in 920 μl H<sub>2</sub>O<sub>nukleasefrei</sub> gegeben.

**Acrylamid-Bisacrylamid:**

Ein Meßzylinder wurde mit 500 ml Wasser aufgefüllt. Hierin wurden 150 g Acrylamid, 2,5 g Bisacrylamid und 2,5 g Amberlite eingewogen. Der Ansatz wurde bei mittlerer Drehgeschwindigkeit eine Stunde auf dem Magnetrührer gerührt und durch einen Filter (Schleicher & Schuell) in eine dunkle Flasche gegossen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

**PAG-Grundlösung:**

a) 8% PAA (zur Herstellung der kleinen Gele):

Acrylamid-Bisacrylamid 30:0,5	53,3 ml
5 x TBE-Puffer	40 ml
Glycerol 40%	10 ml
H <sub>2</sub> O	ad 200 ml

b) 10% PAA (für die SSCP):

5 x TBE	42 ml
40% PAA	52,5 ml
Glycerol	10,5 ml
H <sub>2</sub> O	105 ml

**APS (Ammoniumpersulfat):**

Die Anfertigung einer 4%igen APS-Lösung erfolgte durch Einwaage von 0,4 g APS in 10 ml Wasser.

**1 x TBE-Puffer:**

5 x TBE-Puffer wurde im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt.

**0,5 x TBE-Puffer:**

Analog zur Herstellung des obigen Puffers wurde der 5 x TBE-Puffer diesmal 1:10 mit Wasser verdünnt.

**Formamid-Denaturierungslösung:**

Sie setzte sich zusammen aus 95% Formamid und jeweils 0,05% Bromphenolblau und Xylencyanol. Zur Herstellung wurden 1900 µl Formamid mit 50 µl 2%iger Bromphenolblau- und 50 µl 2%iger Xylencyanollösung versetzt. Um ein besseres Absinken der Proben in die Taschen zu gewährleisten, wurde die Lösung zusätzlich im Verhältnis 1:5 mit einer 1%igen Dextranlösung aufgefüllt.

**Silberfärbung:****I. Fixierer (Puffer A):**

Zur Herstellung wurden 50 ml Eisessig mit 500 ml Ethanol versetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 5000 ml aufgefüllt.

**II. Silberlösung (Puffer B):**

2 g  $\text{AgNO}_3$  wurden in 1000 ml Wasser aufgelöst.

**III. Entwickler (Puffer C):**

Dieser Puffer wurde für jeden Färbvorgang frisch angesetzt. Hierzu wurden 15 g NaOH in 1000 ml Wasser gelöst und mit 4 ml 37%igem Formaldehyd versetzt.

**IV. Fixierer nach der Färbung (Puffer D):**

Zur Herstellung wurden 7,5 g Natriumcarbonat in 1000 ml Wasser gelöst.

**V. Konservierungslösung:**

Es wurden 100 ml Glycerin mit Wasser auf ein Volumen von 1000 ml verdünnt.

**Ethidiumbromidlösung:**

Für eine 0,02%ige Ethidiumbromidlösung wurden 300 ml Wasser mit 60 µl Ethidiumbromid versetzt.

## II.1.2 Oligonukleotide:

### **k-ras:**

Primer (sense):

A(+): ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT

Primer (antisense):

B(-): TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC

C(-): TAA TAT GTC GAC TAA AAC AAG ATT TAC CTC

Die unterstrichenen Basen präsentieren Mismatches von der Kirsten-*ras* DNA-Sequenz.

Die verwendeten Primer wurden nach der Beschreibung von LEVI *et al.*, 1991 angefertigt.

### **E-Cadherin:**

Exon 6 (sense).	CTC ACT TGG TTC TTT CAG
Exon 6 (antisense):	AAC CTT TGG GCT TGG ACA
Exon 7 (sense):	AGC TTG TCT AAA CCT TCA TC
Exon 7 (antisense):	GCT TAG ACC ATC ACT GTA TT
Exon 8 (sense):	TTG GTT GTG TCG ATC TCT CT
Exon 8 (antisense):	CAG TGG TAC CCT TAG TTC AT
Exon 9 (sense):	GTA CTT GTA ATG ACA CAT CTC
Exon 9 (antisense):	TGC CAG TTT CTG CAT CTT GC
Exon 10 (sense):	ACT TCA TTG TTT CTG CTC TC
Exon 10 (antisense):	AAC CAG TTG CTG CAA GTC AG

Die Anfertigung der Primer erfolgte nach den Angaben von BERX *et al.*, (1995) von der Firma GIBCO BRL/Life Technologies, Eggenstein.

### Biologisches Material

Die Zelllinie KATO III wurde von der „American Type Culture Collection“ (ATCC) bezogen.

Sie wurde im Kulturmedium RPMI 1640 angezchtet und anschließend zur DNA-Isolation verwandt.

## **II.2 Methodik**

### **II.2.1 Probensammlung**

Nach intraoperativer Entnahme der Gewebeproben wurden diese mittels Tissue-Tec<sup>®</sup> auf 1 cm Durchmesser betragenden Korkplättchen fixiert und bei -80°C kryokonserviert. Aus jedem Gewebeblock erfolgte an einem Gefriermikrotom (Kry 220, MTE, Firma Slee Technik, Mainz) die Anfertigung eines 5 µm dicken Schnittes mit anschließendem Aufbringen der Schnitte auf Objektträger. Er diente der histologischen Absicherung der Diagnose und wurde mittels HE-Färbetechnik angefärbt. Aus dem sich direkt an die 5 µm dicken Schnitte anschließenden Gewebematerial wurden 10 µm Dicke betragende Präparate angefertigt, die der DNA-Isolation für die nachfolgenden Untersuchungen dienten.

### II.2.2 HE-Färbung

Die 5 µm dicken Schnitte wurden zuerst für 3 Minuten in Hämalaun (nach MAYER) gegeben. Anschließend wurde die überschüssige Färbelösung durch kurzes Eintauchen in Wasser abgespült. Für den zweiten Färbeschritt wurden die Objektträger für 1 Minute in 1%iges, wässriges Eosin G gegeben und danach in Aqua <sub>dest.</sub> gespült. Es folgte ein Eintauchen der Präparate in eine aufsteigende Alkoholreihe von 70%igem, 96%igem und 99,5%igem Ethanol für einen Zeitraum von 2-3 Minuten, anschließend ebenfalls für 2-3 Minuten in Xylol. Die gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe von Depex eingedeckt.

### II.2.3 Mikroskopie

Zur Überprüfung der histologischen Diagnose sowie der Repräsentabilität der Schnittebene wurden die HE-gefärbten Schnitte anschließend mikroskopisch begutachtet.

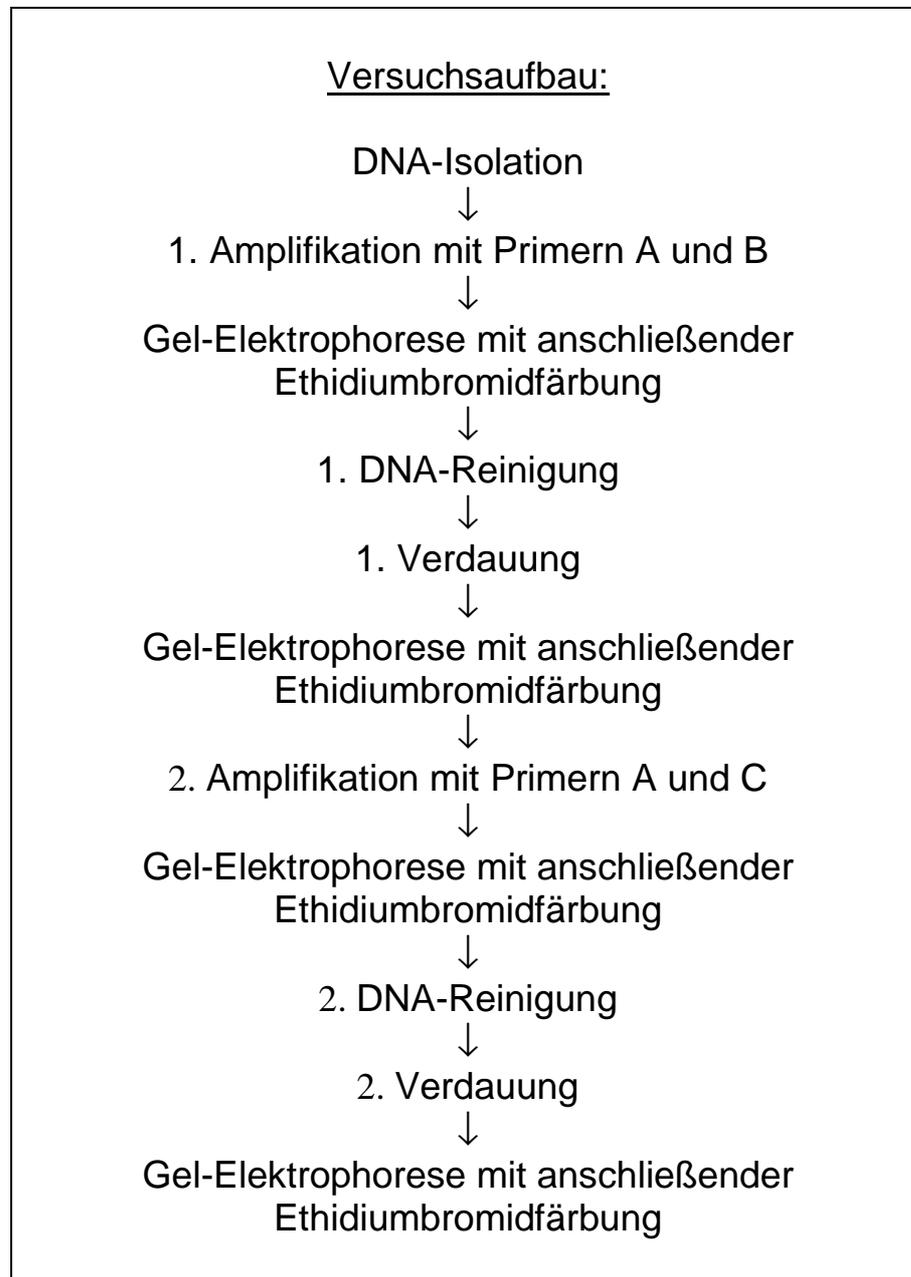


Abb. 8: Flußdiagramm über den Versuchsaufbau der Untersuchungen zu k-ras

## II.2.4 DNA- Isolation

Das Ausmaß der Gewebeproben wurde auf Millimeterpapier aufgemalt. Durch Auszählen der Kästchen erfolgte die Bestimmung der Fläche in  $\text{cm}^2$ . Die planimetrierten Präparate wurden mit einem sterilen Skalpell (Feather No.11) vom Objektträger gekratzt und anschließend in ein beschriftetes Reaktionsgefäß (Eppendorf, Nr. 3810, Hamburg) eingebracht. Zur Lysierung der Zellwände wurden je  $\text{cm}^2$  Gewebsfläche 100  $\mu\text{l}$  0.5%ige SDS-Lösung hinzugegeben und mit einer Pipette durchmischt. Während einer anschließenden Inkubationszeit von 30 min wurden die Reaktionsgefäße bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  im Thermomixer (Eppendorf, Nr. 5436, Hamburg) geschüttelt. Je  $\text{cm}^2$  Gewebsfläche wurden den Proben 100  $\mu\text{l}$   $2 \times$  DNA-Puffer/Proteinase-K-Gemisch beigefügt, wobei die Proteinase-K-Endkonzentration im Reaktionsgefäß 1 mg/ml betragen sollte. Schließlich wurden die Proben bei  $37^\circ\text{C}$  etwa 16-20 Stunden im Thermomixer inkubiert.

Ebenfalls im Thermomixer wurden die Proben 8 min lang auf  $95^\circ\text{C}$  aufgeheizt, um eventuelle Proteinase-K-Reste zu zerstören. Die im Reaktionsgefäß vorhandenen Volumina wurden mit der 2,5-fachen Menge an 100%igem Ethanol ergänzt und zur DNA-Fällung für 10 min bei  $-80^\circ\text{C}$  (oder über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$ ) gekühlt. Die Proben wurden 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13000 U/min der Zentrifuge (Eppendorf, Nr. 5403, Hamburg) zugeführt. Dieser Überstand wurde ebenfalls dekantiert, wonach die Entfernung der letzten Tropfen mit Filterpapier erfolgte. Um das komplette Abdampfen der Ethanolreste zu gewährleisten, wurde das Pellet bei geöffnetem Reaktionsgefäß 10 min getrocknet.

Hierbei erwies es sich als sinnvoll, vorher die Stelle im Reaktionsgefäß zu markieren, an der die DNA haftet, da sie in getrocknetem Zustand sehr schlecht sichtbar ist. Pro  $\text{cm}^2$  Gewebeprobe wurden 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben und damit der gereinigte Niederschlag sorgfältig resuspendiert. Die anschließende Lagerung der isolierten Proben erfolgte bei  $-20^\circ\text{C}$ .

## II.2.5 Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die von KARY B. MULLIS 1983 erdachte (und 1986 veröffentlichte) Methode erlaubt es, mit Hilfe eines einzigen Moleküls der Erbsubstanz DNA, interessierende DNA-Fragmente millionenfach zu vervielfältigen und so einer Untersuchung zugänglich zu machen.

Das Hauptproblem in der Untersuchung und Analyse spezieller Genloci bestand früher darin, diese aus dem riesigen Genom zu isolieren (ein Säugetiergenom enthält bis zu 100000 verschiedene Gene).

Die PCR ermöglicht eine *in-vitro* Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Mit ihrer Hilfe lassen sich spezifische DNA-Sequenzen amplifizieren, von denen nur die sie umrahmenden DNA-Sequenzen bekannt sein müssen.

Das Reaktionsprinzip der PCR gleicht dem Replikationsvorgang in der Zelle. Hier verwendet die DNA-Polymerase die Einzelstrang-DNA als Matrize zur Synthese eines neuen, komplementären Stranges.

Im Reagenzglas kann man diesen Vorgang dadurch nachahmen, daß man die natürlicherweise in doppelsträngiger Form vorliegende DNA nahe dem Siedepunkt erhitzt und auf diese Weise die erforderlichen einzelsträngigen DNA-Vorlagen erhält. Durch Isolation einer thermostabilen DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus*, einem thermophilen Bakterium, wurde eine Automatisierung der Methodik möglich (SAIKI *et al.*, 1987).

Für den Synthesebeginn ist außer der Zugabe von DNA-Polymerase zusätzlich das Vorhandensein kurzer doppelsträngiger DNA-Anteile notwendig. Dazu finden *in vitro* künstlich synthetisierte Oligonukleotide (englisch: „primer“) Verwendung, die so ausgewählt werden, daß sie aus den benachbarten Regionen des zu amplifizierenden Genes stammen.

Die Durchführung der PCR-Reaktion erfolgt in drei Teilschritten, die 30 bis 60 mal wiederholt werden:

- 1.: Denaturierung:** der DNA-Doppelstränge: Dieser Teilschritt erfolgt bei einer Temperatur von ca. 90°C und beabsichtigt die Aufschmelzung der DNA-Stränge.
- 2.: Annealing:** Hierzu wird der Reaktionsansatz auf ca. 50°C abgekühlt, was die Hybridisierung der Oligo-

nucleotidprimer mit den beiden DNA-Matrizensträngen bewirkt

**3.: Polymerisation:** Dieser Schritt dient der eigentlichen Vervielfältigung. Dafür wird die für die Funktion der *Taq*-Polymerase optimale Temperatur von 72°C gewählt.

### II.2.5.1 Die Vermehrung der DNA-Fragmente

Der erste Zyklus beginnt damit, daß sich an der nativen DNA ein Primer anlagert und von der DNA-Polymerase ein komplementärer Strang in 3`-5`-Richtung produziert wird, der kein definiertes Ende hat. Abgebrochen wird die Reaktion erst durch erneute Temperaturänderung. An diesem Fragment unklarer Länge lagern sich dann erneut die komplementären Primer an, und dieses Mal wird die Reaktion durch das Ende der Matrize bestimmt. Zu Beginn des dritten Zyklus stehen somit erstmals zwei Matrizen in der Länge der zu amplifizierenden Zielsequenz zu Verfügung. Diese werden in den nachfolgenden Zyklen exponentiell vermehrt, während die anfänglich entstandenen Fehlprodukte höchstens linear vermehrt werden. Eingeschränkt wird dieser Prozeß durch verschiedene Faktoren wie Nukleotidkonzentration, abnehmende Primerkonzentration und sinkende Aktivität der DNA-Polymerase. Die Reaktionsausbeute variiert von Zyklus zu Zyklus und liegt bei durchschnittlich 85%.

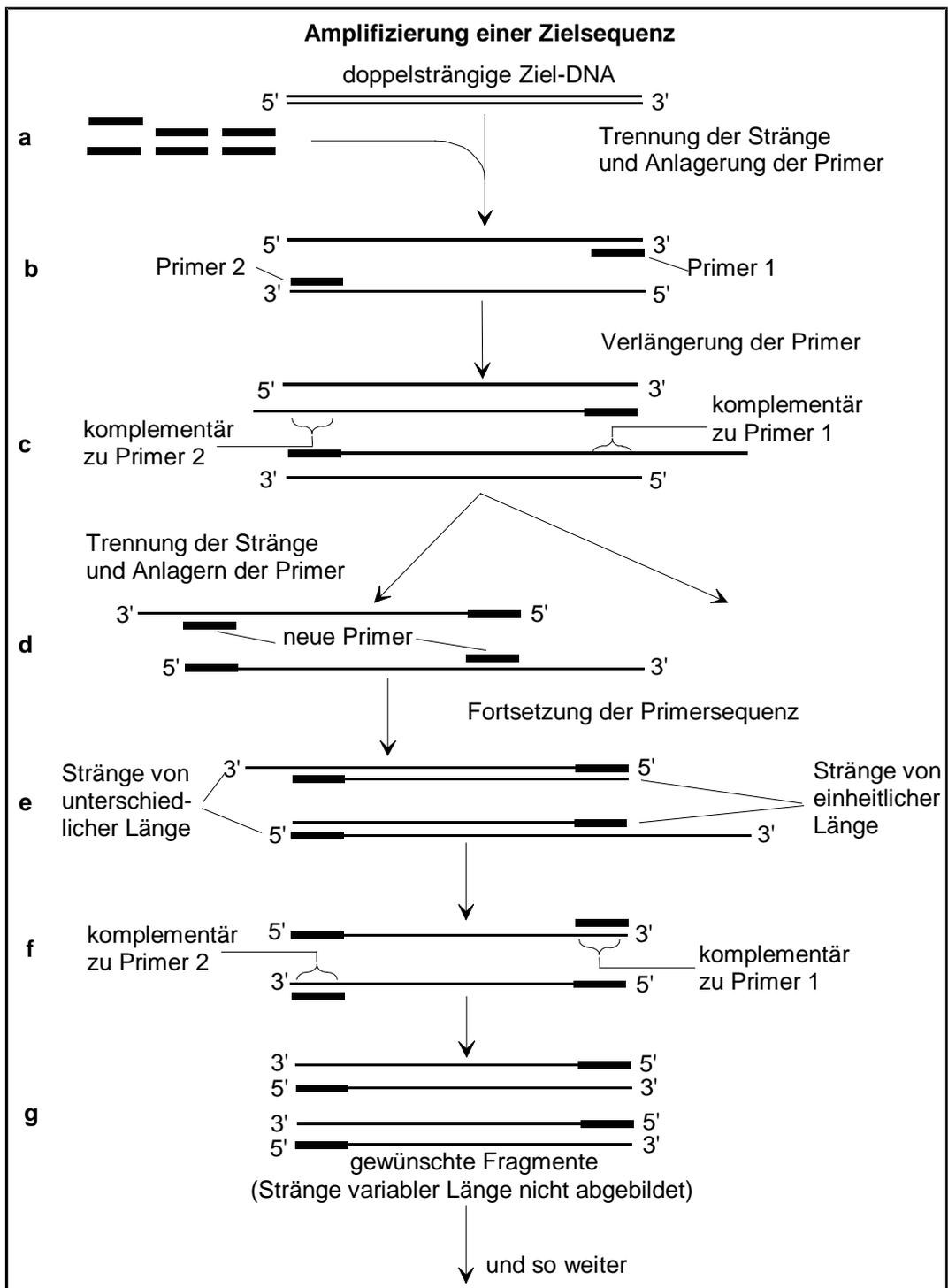


Abb.9: modifiziert nach NEWTON et al., (1994):(a) Ausgangsmaterial ist ein doppelsträngiges DNA-Molekül. (b) Die Stränge werden durch Erhitzen des Reaktionsgemisches getrennt und dann abgekühlt, so daß die Primer sich an die beiden Primer-Bindestellen, die an die Zielregion angrenzen, binden, je einer an jeden Strang. (c) Die Taq-Polymerase synthetisiert komplementär zur Matrize neue DNA-Stränge, die unterschiedlich weit über die Position der Primer-Bindestelle auf der anderen Matrize hinausragen. (d) Das Reaktionsgemisch wird erneut erhitzt. Die ursprünglichen und die neu synthetisierten Stränge trennen sich. Nun stehen vier Bindestellen für die Primer zur Verfügung, je eine auf jedem der ursprünglichen Stränge und den beiden neuen DNA-Strängen. (Der Einfachheit halber sind bei den folgenden Vorgängen die ursprünglichen Stränge weggelassen.) (e) Die Taq-Polymerase synthetisiert neue komplementäre Stränge, die Ausdehnung dieser Ketten ist jedoch genau auf die Zielsequenz begrenzt. Die beiden neu synthetisierten Ketten erstrecken sich also genau auf den von den Primern festgelegten Bereich. (f) Der Vorgang wird wiederholt, und die Primer binden an die neu synthetisierten Stränge (und auch an die in dieser Abbildung nicht dargestellten Stränge variabler Länge). (g) Die Taq-Polymerase synthetisiert komplementäre Stränge und stellt so zwei doppelsträngige DNA-Fragmente her, die identisch mit der Zielsequenz sind. Der Vorgang wiederholt sich viele Male.

## k-ras

### II.2.6 Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

#### II.2.6.1 Die Funktion von Restriktionsenzymen

ARBER, NATHANS und SMITH bekamen 1978 den Nobelpreis für die Entdeckung virusabwehrender Restriktions-Modifikationssysteme von Bakterien. Bakterielle Endoribonukleasen, die sogenannten Restriktionsenzyme, erkennen spezifische, spiegelbildlich aufgebaute DNA-Sequenzen (Palindrome). Eindringene Virus-DNA wird an diesen Sequenzen gespalten, während identische bakterieneigene DNA-Sequenzen durch Modifikation (Methylierung) vor der Enzymwirkung geschützt bleiben. Diese Restriktionsenzyme können gentechnologisch genutzt werden. Mit ihrer Hilfe ist man z.B. in der Lage, von jedem Individuum eine Restriktionskarte herzustellen.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode macht sich die Tatsache zunutze, daß mit Hilfe dieser Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen auch mutierte Gene von ihrem Wildtyp-Gen unterschieden werden können. Voraussetzung ist hierbei, daß die zu untersuchende Sequenz bekannt ist, damit ein für ihre Untersuchung geeignetes Restriktionsenzym ausgewählt werden kann. Das Enzym sollte zum einen das zu untersuchende Fragment nicht zu häufig schneiden, zum anderen müssen für die Validität der Untersuchung Genloci bekannt sein, deren Mutation bevorzugt auftreten und dann in der Folge zur Änderung des Phänotyps der Zelle führen.

Mutationen im k-ras-Gen zeigten sich im Bereich der für die Aminosäuren 12, 13 und 61 sowie 116 und 119 kodierenden Nukleotide (Bos *et al.*, 1985, VARMUS, 1984). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß sich die bevorzugte Lokalisation der Mutationen auf das Codon 12 konzentriert (z.B. ALMOGUERA *et al.* 1988, SMIT *et al.* 1988, MARIYAMA *et al.* 1989).

## II.2.7 Two-Step-RFLP-Analyse von k-ras

Die Methodik wurde mit leichten Modifikationen von LEVI *et al.*, 1991 übernommen.

Für die Analyse wurde das Restriktionsenzym *Bst*NI I verwendet. Seine Erkennungssequenz lautet: CC↓<sup>A</sup>TGG.

JIANG *et al.* (1989) entwickelten eine Methode zur Untersuchung von Mutationen am Codon 12 des k-ras-Gens mit sog. mismatched primers. Indem sie einen Primer herstellten, der ein Cytosin-Molekül an Position 1 von Codon 11 einschleust, schufen sie durch Amplifikation der DNA eine künstliche Restriktionsstelle für das Enzym *Bst*NI I, die die ersten beiden Nukleotide von Codon 12 überlappt.

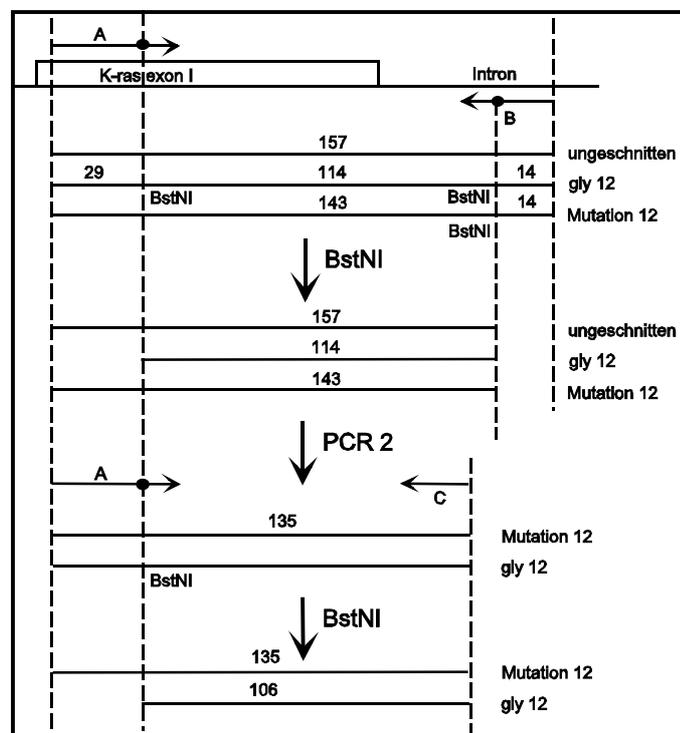


Abb. 10: Nach LEVI *et al.*, 1991: Methodik der Two-Step-RFLP (Erläuterung siehe Text auf der folgenden Seite)

Durch die PCR mit den Primern A und B entsteht ein 157 Basenpaar langes Fragment, das zwei Restriktionsstellen für *Bst*NI enthält, wenn Codon 12 dem Wildtyp (gly 12) entspricht. Im Falle einer Mutation von Codon 12 an einer der ersten beiden Basen verschwindet die eine Restriktionsstelle. Anhand der zweiten Restriktionsstelle ist somit eine Differenzierung zwischen mutierten und unverdauten Ansätzen möglich.

Bei Vorliegen eines Wildtyps entstehen also drei Fragmente mit den Basenlängen von 29, 114 und 14. Eine Mutation hingegen hat die Entstehung von zwei Fragmenten mit den Basenlängen 143 und 14 zur Folge.

Eine zweite PCR mit den Primern A und C bewirkt eine selektive Amplifikation der mutierten 143-Basenpaarprodukte, da die Anlagerungsstelle für den Primer A durch Abspaltung des Fragmentes vor dem Bereich des normalen Codons verloren gegangen ist.

Durch die zweite Amplifikation entsteht ein 135-Basenpaar-Fragment, das durch *Bst*NI an einer Stelle geschnitten wird, wenn die Codon 12-Sequenz normal ist, während durch eine Mutation an einer der beiden ersten Basen die Restriktionsstelle verschwindet.

Das Symbol (•) an den Primern zeigt die Einfügung eines Mismatches in die normale DNA-Sequenz an, welches unter den aufgezeigten Bedingungen eine Restriktionsstelle für *Bst*NI entstehen läßt.

## II.2.8 Durchführung der PCR

Das Endvolumen des für die PCR verwendeten Reaktionsansatzes sollte 100  $\mu\text{l}$  betragen. Er setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Es wurden pro Probe je 77,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{nukleasefrei}}$  vorgelegt und mit 10  $\mu\text{l}$  10 x Amplifikationspuffer (15 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 10  $\mu\text{l}$  10 x dNTP's, jeweils 1  $\mu\text{l}$  (50 pmol/ $\mu\text{l}$ ) sowohl des Sense - als auch des Antisenseprimers und 0,5  $\mu\text{l}$  Ampli-*Taq*-Polymerase vermischt. Der angefertigte Mastermix wurde anschließend auf 0.5 ml fassende Reaktionsgefäße (Perkin Elmer, Norwalk, USA) verteilt und mit ca. 40  $\mu\text{l}$  filtriertem Mineralöl überlagert. Jeder Ansatz beinhaltete die Anfertigung einer Negativkontrolle, die sich von den regulären Proben nur durch fehlenden Zusatz der DNA unterschied. Von den zu amplifizierenden DNA-Isolationen wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  zu dem Ansatz pipettiert.

Die PCR wurde jeweils über 30 Cyclen durchgeführt. Initial erfolgte eine fünfminütige Denaturierung der Proben bei 96°C. Die Zyklen setzten sich aus einem einminütigen Denaturierungsschritt bei 96°C, der Annealing-Temperatur von 55°C ebenfalls für eine Minute und dem nachfolgenden Polymerisationsschritt bei 72°C für 30 Sekunden zusammen. Ein abschließender Auffüllschritt noch nicht vollständig polymerisierter DNA-Stränge erfolgte für 10 min bei 72°C.

### PCR:

Zubereitung des Amplifikationsgemisches:

1) dD  $\text{H}_2\text{O}$ : (Anzahl der Proben x 100  $\mu\text{l}$  -  $\Sigma$  ( $\mu\text{l}$ ) von 2)-6))

2) 10 x Ampl. Buffer	10 $\mu\text{l}$ je Probe
3) 10 x dNTP-Lösung	10 $\mu\text{l}$ je Probe
4) Primer sense	1 $\mu\text{l}$ je Probe
5) Primer antisense	1 $\mu\text{l}$ je Probe
6) <u>Taq Polymerase</u>	<u>0,5 <math>\mu\text{l}</math> je Probe</u>

$\Sigma$  22,5  $\mu\text{l}$  je Probe

## **II.2.9 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese**

### **II.2.9.1 Aufbau der Gießkammer**

Es wurden Spacer und Kämme mit 1,5 mm Dicke verwendet. Alle mit dem Gel in Kontakt tretenden Flächen wurden zuvor mit Silikon-Lösung benetzt. Ein 8%iges Polyacrylamid-Gel wurde nach folgendem Schema gegossen:

- 1. 12 ml Acrylamid (PAG)
- 2. 96 µl 4% Ammonium-Persulfat (APS)
- 3. 22 µl Temed

Zum Einsatz kamen je nach Anzahl der bearbeiteten Proben Kämme, die 10 Taschen mit einem Fassungsvermögen von  $13 \times 5,5 \times 1,5 \text{ mm}^3$  oder 15 Taschen mit einem Fassungsvermögen von  $13 \times 3 \times 1,5 \text{ mm}^3$  ausbildeten.

### **II.2.9.2 Elektrophorese**

Nach vorsichtigem Entfernen der Kämme wurden die Taschen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  ausgespült. Die Elektrophoresewanne (Mini Protean II, Bio Rad, Burlington, USA) wurde mit 1 x TBE-Puffer gefüllt. Jeweils 10 µl der Proben wurden mit Gel Loading Solution im Verhältnis von 1:4 gemischt und in die Geltaschen einpipettiert. Zusätzlich liefen 1,5 µl des Längenstandardes 174  $\Phi$ HINF I - ebenfalls mit Gel-Loading-Solution vermischt - mit. Die Elektrophorese wurde über 40 min bei 150 Volt durchgeführt.

### **II.2.9.3 Färbevorgang**

Das Gel wurde jeweils 6 min in 0.02%iger Ethidiumbromidlösung geschaukelt und anschließend zweimal für ebenfalls 6 min in  $\text{H}_2\text{O}$  entfärbt, um das nichtgebundene Ethidiumbromid zur stärkeren Kontrastierung des Hintergrundes auszuwaschen.

## **II.2.10 Aufreinigung der DNA**

### **1. DNA- Reinigung:**

Zur Anwendung für den Reinigungsschritt nach der ersten Amplifikation kam das Glass Max™ DNA Isolation Spin Cartridge System ( Fa. Gibco-BRL; Cat. No. 5590 UA/UB, Gaithersburg, USA).

Die Durchführung der Reinigung erfolgte gemäß dem zu diesem Kit mitgelieferten Handbuch.

### **2. DNA-Reinigung:**

Zur Kontrolle durchgeführte Polyacrylamidgelelektrophoresen konnten zeigen, daß die DNA-Ausbeute mit Hilfe des Reinigungskits nicht besonders hoch war, so daß nach der zweiten PCR eine Ethanol-fällung durchgeführt wurde. Die amplifizierten Proben wurden unter der Mineralölschicht abpipettiert und in einem neuen Reaktionsgefäß analog zur DNA-Extraktion mit dem 2,5-fachen Volumen an gekühltem 100%igen Ethanol ergänzt.

## **II.2.11 Verdauung**

Die Restriktionsenzymverdauungen mit BstN1 wurden nach den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Die Digestion erfolgte über einen Zeitraum von 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden bei 60°C im Wasserbad (Haake CH Fisons, Valencia, USA).

## **II.2.12 Photodokumentation**

Zur Bilddokumentation wurde eine Polaroidkamera (MP-4, Polaroid, Offenbach) verwendet. Die Gele wurden bei Blende von 4,5 und einer Belichtungszeit von 1 Sekunde fotografiert.

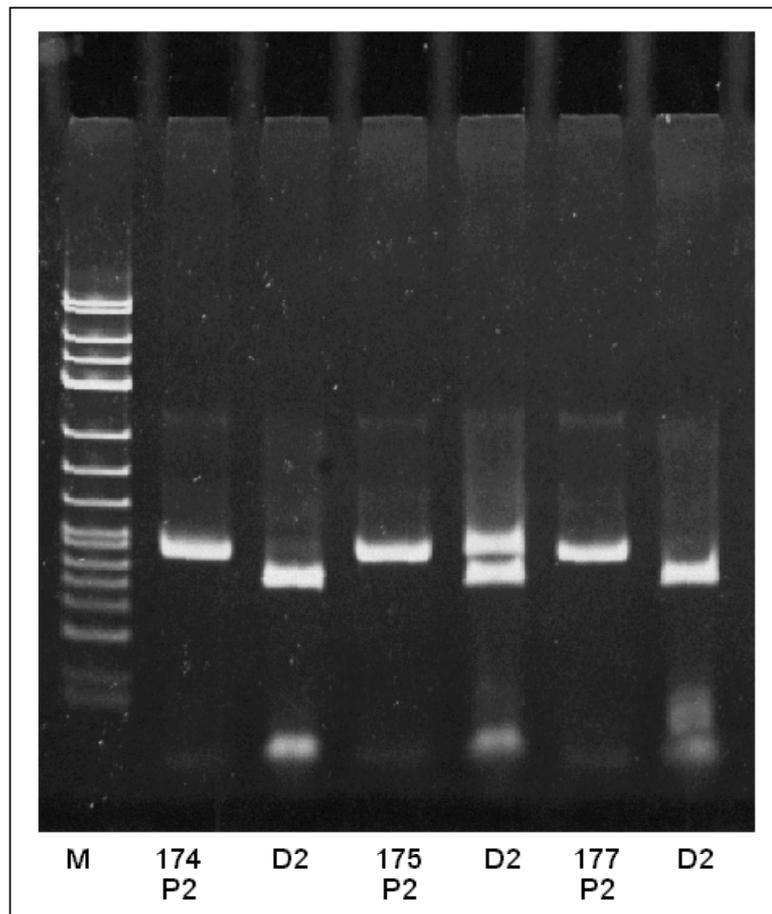


Abb. 11: Fotodokumentation nach erfolgter Gelelektrophorese. M = Längenstandard.

P2: Proben nach Durchführung der 2. PCR. D2: Proben nach Durchführung der 2. Verdauung: Wildtyp-DNA wird durch die Restriktion mit Bst N1 in zwei kürzere Fragmente gespalten. Diese verkürzten Fragmente wandern schneller in Richtung Anode und werden dadurch weiter nach unten getragen als vor erfolgter Verdauung. Man erkennt eine Bande, die etwas weiter unten im Gel als das noch nicht geschnittene Pendant nachweisbar wird sowie ein kleines weiteres Fragment, das aufgrund seiner Kürze das Ende der Bahn fast erreicht hat. Probe Nr. 175 enthält eine Mutation des *k-ras*-Gens an Codon 12 und weist sowohl ein verdautes wie auch ein mutiertes, nicht verdaubares Allel auf, was die typische Doppelbandenausbildung zur Folge hat.

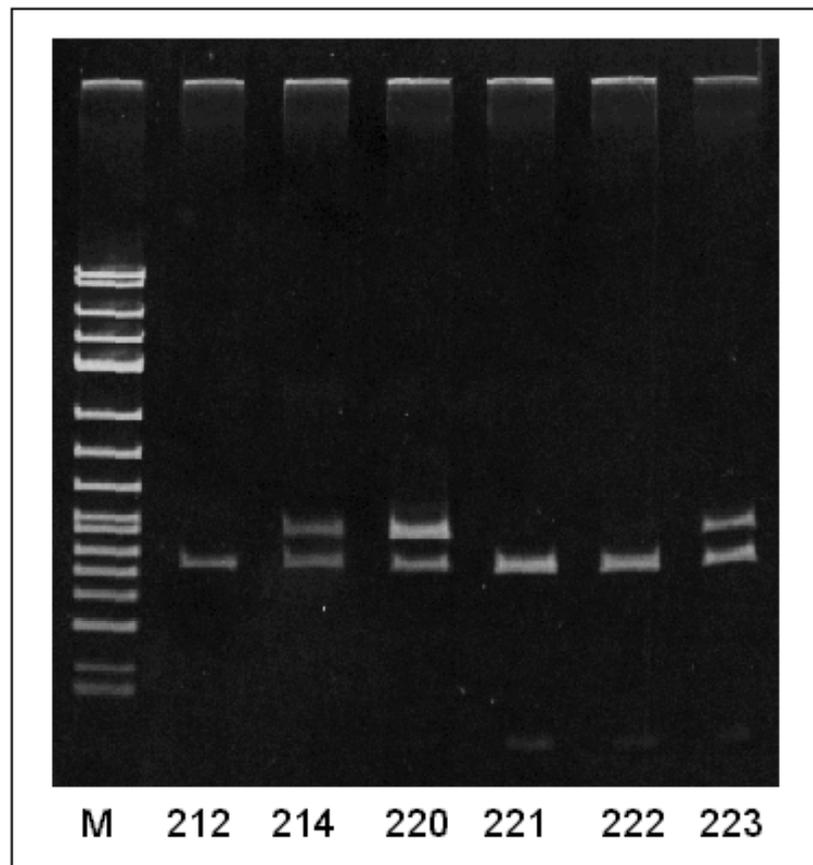


Abb. 12: Fotodokumentation nach Durchführung der 2. Verdauung. M = Längenstandard. Die Proben 212, 221 und 222 weisen Wildtyp-DNA auf, die Proben 214, 220 und 223 dagegen präsentieren eine Mutation an Codon 12 des k-ras Gens.

### **II.2.13 DNA-Isolation E-Cadherin**

Da die Amplifikation verschiedener Exone des Genes E-Cadherins einer größeren einzusetzenden DNA-Menge bedurfte, wurden erneute DNA-Isolationen durchgeführt. Ebenfalls isoliert wurde DNA aus der Zelllinie KATO III; deren bekannte E-Cadherin-Mutation für Exon 7 als Positivkontrolle dienen sollte.

Die bereits für die Untersuchung von *k-ras* beschriebene Methode zur DNA-Isolation wurde leicht modifiziert; es erfolgte eine Phenolextraktion zur besseren Proteinabtrennung.

Hierzu wurde das Probenvolumen mit steril filtriertem TE-Puffer auf 1000 µl erhöht. Die Reaktionsansätze wurden mit dem gleichen Volumen an gesättigtem Phenol aufgefüllt und kurz gevortext. Anschließend wurden die Proben für 25 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Hierdurch kam es zur Abtrennung dreier Phasen: der unteren Phenolphase, der sich anschließenden Interphase (bestehend aus dem Proteinniederschlag) und der oberen DNA-Phase. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, ohne die Interphase mit der Pipettenspitze anzusaugen. Die Wiederholung dieses Extraktionsschrittes erfolgte so lange, bis keine Interphase mehr vorhanden war. Die nachfolgende Extraktion mit 4% Isoamylalkohol in Chloroform wurde nach gleichem Schema durchgeführt und diente der Entfernung von Phenolresten.

Zur DNA-Fällung wurden die Proben mit 120 µl NaCl und 1000 µl Isopropanol (alternativ zu dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol) vermischt und mindestens 30 min inkubiert. Sie wurden in die auf 4°C vorgekühlte Zentrifuge verbracht und dort für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Isopropanol wurde dekantiert. Es erfolgte ein Waschschrift mit einem Volumen 70%igem Ethanol, wonach die Proben erneut für 15 min bei 14.000 rpm in die ebenfalls auf 4°C abgekühlte Zentrifuge verbracht wurden. Der Ethanolüberstand wurde ebenfalls dekantiert.

Die Proben wurden im Speedvac (Vacuum Concentrator, Bachofer, Reutlingen) getrocknet und das Pellet in 100 µl TE-Puffer aufgelöst.

#### **II.2.14 Photometrie**

Es wurden ein Photometer (UV-1202, Shimadzu, Kyoto, Japan) mit einer 80-µl-Quarzküvette benutzt. Zu Beginn wurde der Leerwert der Proben mit 75 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gemessen. Nach Hinzufügen von jeweils 5 µl der Isolate wurde der Meßvorgang gestartet. Sowohl die Extinktionen bei 260 nm (A1; DNA) als auch bei 280 nm (A2; Protein) wurden gemessen und der Quotient aus A1:A2 gebildet.

Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

(Faktor 50  $\Rightarrow$  dsDNA: 1 optische Dichte = 50 µg/ml)

Die Extinktion der Proben sollte zwischen 0,1 und 1 betragen, da das Photometer nur hier im linearen Bereich messen kann. War dies nicht der Fall, weil zu wenig Substrat vorhanden war, so wurden weitere 5 µl des Isolates hinzugefügt. Der Extinktionsquotient A1:A2 sollte zwischen 1,6 (1,8) und 2,0 betragen, was eine gute Reinigung der Isolationen von DNA anzeigt.

#### **II.2.15 Anfertigung von Standardlösungen**

Nach Berechnung der DNA-Konzentrationen in den Isolationen wurden Standardlösungen angesetzt, die 50 ng DNA/µl enthielten. Sie wurden in die PCR eingesetzt.

#### **II.2.16 Durchführung der PCR**

Es wurden Reaktionsansätze mit Endvolumina von 50 µl angefertigt. Die Beobachtung unspezifischer Produkte veranlassten die Anfertigung von Verdünnungsreihen mit verschiedenen MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen. Als

vorteilhaft erwies sich eine Endkonzentration von 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Es wurden daher ein MgCl<sub>2</sub>-freier Puffer in Verbindung mit einer MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM MgCl<sub>2</sub>) verwendet.

Zur Erlangung einer höheren Stringenz wurde eine Touch-Down-PCR durchgeführt. Hierbei wurde die Annealing-Temperatur der Primer um 5°C oberhalb der Ausgangstemperatur begonnen und alle zwei Zyklen um 1°C reduziert. Somit wurde diese nach 10 Zyklen erreicht und die restlichen 25 Zyklen mit der erreichten Temperatur fortgeführt. Diese betrug für die Primer 6, 8 und 9 55°C und für die Primer 7 und 10 60°C. Die initiale Denaturierung erfolgte für 2 min bei 95°C. Die anschließenden Zyklen beinhalteten einen Denaturierungsschritt, der über 30 s ausgeführt wurde, mit dem sich anschließenden Annealingschritt wie oben beschrieben für ebenfalls 30 s und einem Polymerisierungsschritt über 45 s bei 72°C. An den letzten Zyklus schloß sich ebenfalls eine Auffüllphase der noch nicht vollständig polymerisierten Stränge an, die für 5 min bei 72°C ausgeführt wurde.

### **II.2.17 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)**

Grundlage der SSCP (ORITA *et al.*, 1989) ist eine Änderung des gelelektrophoretischen Laufverhaltens von Einzelstrang-DNA aufgrund von Veränderungen in der Gensequenz. Nach Hitze-Denaturierung doppelsträngiger DNA und schnellem Abkühlen auf Eis nehmen die Einzelstränge für sie thermodynamisch günstige Strukturen ein, wobei komplementäre Regionen durch Rückfaltungen interne doppelsträngige Helices, verbunden durch einzelsträngige, schleifenbildende Bereiche (loops) bilden können. Je nach Größe der Schleifen kann die Beweglichkeit der Einzelstränge durch eine Gelmatrix bei einer Elektrophorese beeinflusst sein. Der Austausch eines Basenpaares kann zu einer veränderten Konformation führen, die dann in einer im Vergleich zu einer nichtmutierten Gensequenz verzögerten oder beschleunigten Mobilität im Gel resultiert. Je größer der Einfluß einer gegebenen Mutation auf die Konformation des Einzelstranges ist, desto deutlicher wird ihr Nachweis. Die Abbildung stellt die Methode schematisch dar.

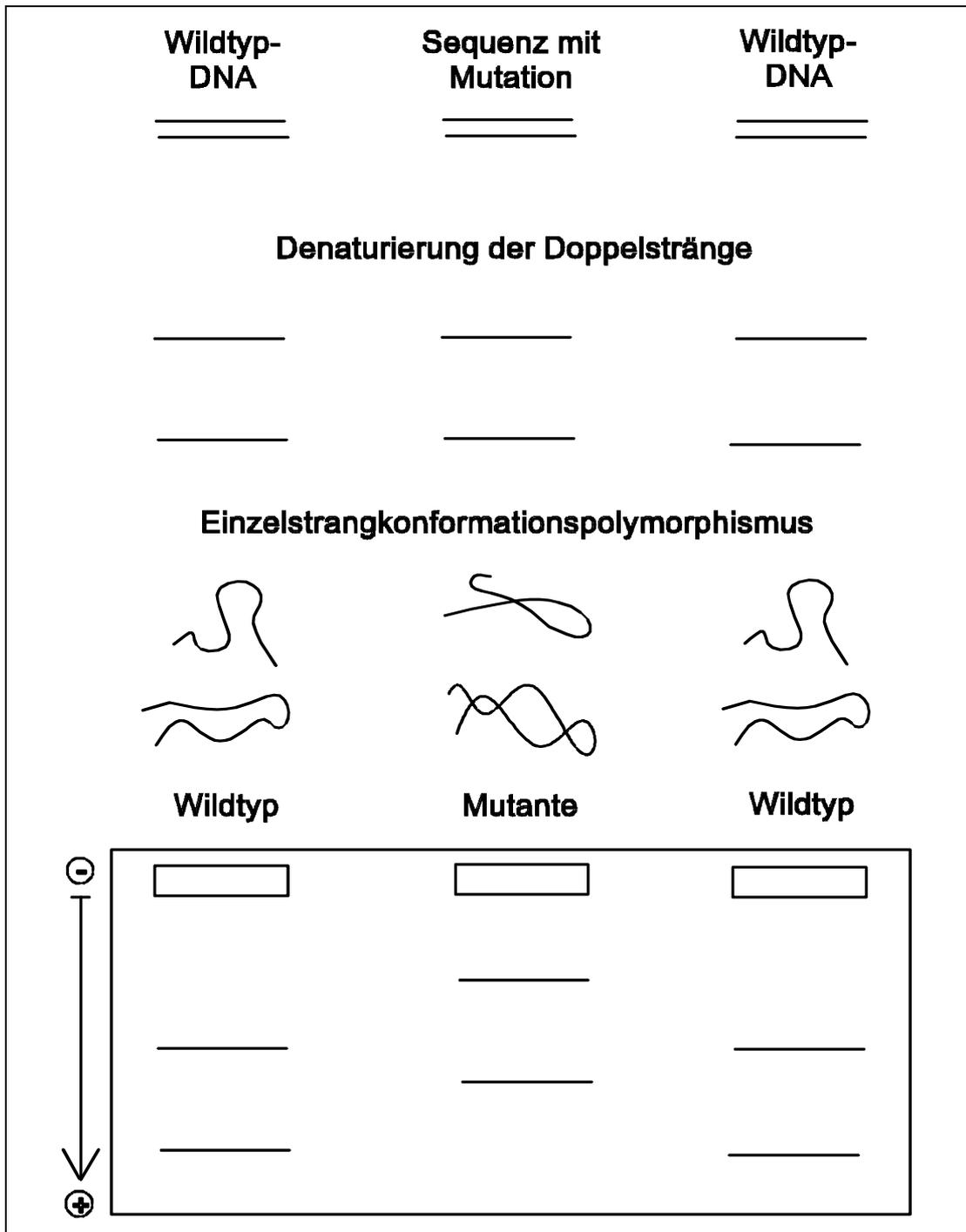


Abb. 11: Mechanismus des Single Strand Conformational Polymorphismus (SSCP)

### **I.2.18 Durchführung der SSCP**

Jeweils 5 µl der Amplifikate wurden mit einem Denaturierungsmix versetzt. Die Proben wurden in TC Microwell-Platten (60 x 10 µl, Nuncleon D SI) pipettiert und für 2 min auf 96°C erhitzt (In-Situ-PCR-Cycler: Touch Down, Thermo Hybaid, Heidelberg). Direkt anschließend wurden die Platten auf Eis gestellt. Es wurden 10%ige Polyacrylamidgele mit Zusatz von 5% Glycerol angefertigt. Die Benutzung vertikaler Gele mit der Größe von 280 x 199 x 0,4 mm<sup>3</sup> erfolgte in Verbindung mit Elektrophoresekammern der Firma Welabo, Düsseldorf. Zur Unterstützung der dünnen Gele wurden Gel Bond PAG-Folien (Thickness 0,2 mm, 199 x 264 mm, Biozym, Landgraaf, Niederlande) verwendet. Die Elektrophorese wurde mit jeder Probe einmal bei Raumtemperatur und zum anderen bei 4°C (im Minicoldlab 2023, Firma LKB, Bromma, Schweden) durchgeführt. An die bei Raumtemperatur gehaltenen Gele wurden 100 Volt angelegt; die gekühlten Gele wurden mit 200 Volt über 18 Stunden gefahren.

### **II.2.19 Silberfärbung**

Das Färbeprotokoll wurde dem TGGE-Handbuch der Firma Qiagen (Hilden) entnommen. Um die Gele länger geschmeidig zu halten wurden sie zusätzlich für mindestens 10 min in 10% Glycerol geschwenkt.

### **II.2.20 Photodokumentation**

Die Gele wurden mittels eines Scanners ( HP Scan Jet 6100C/T, Böblingen) mit Durchlichtaufsatz eingescannt.

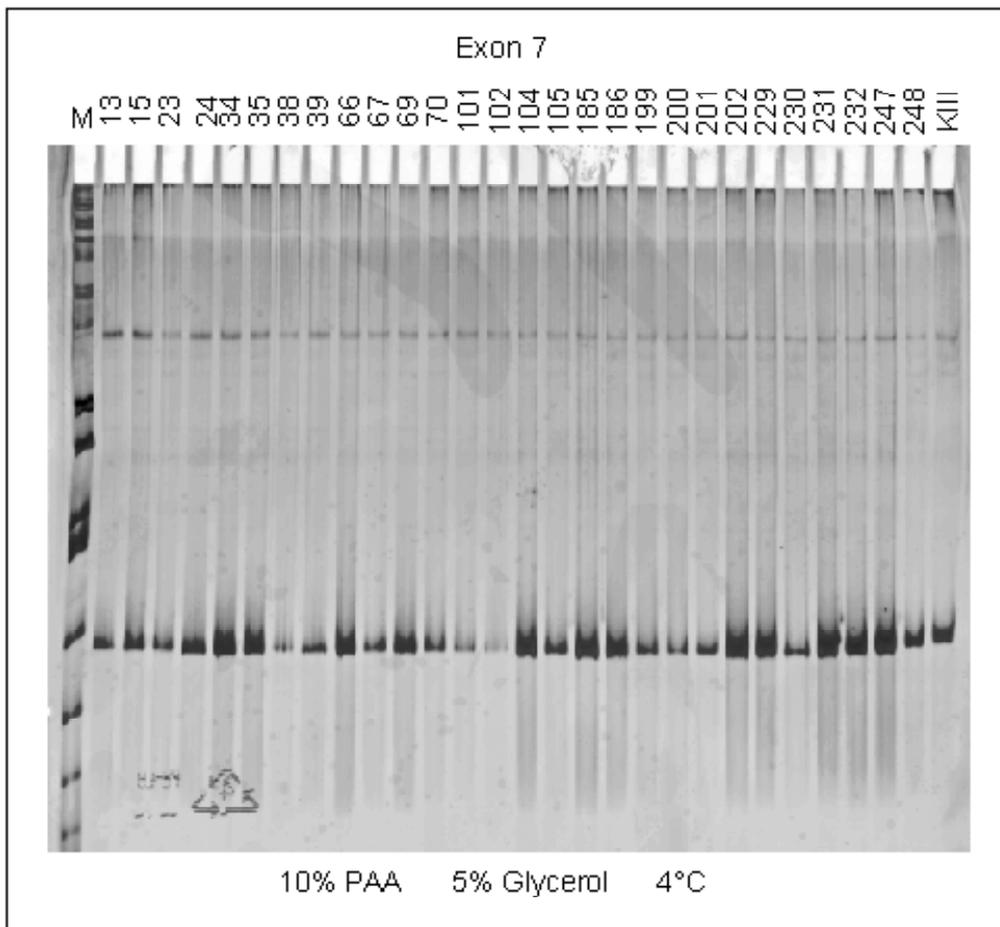


Abb. 13: Fotodokumentation des Polyacrylamidgels nach erfolgter Elektrophorese bei 4°C exemplarisch für Exon 7.

### III. Ergebnisse

#### III.1 k-ras

##### **III.1.1 Patientengut**

Insgesamt untersucht wurden 181 Proben von 81 Patienten. Das Patientengut setzte sich zusammen aus Patienten mit sporadischen kolorektalen Adenomen und Karzinomen, aus Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Patienten mit einer Polyposis coli (FAP).

121 dieser Proben enthielten Gewebe mit einem pathologischen Befund; bei den weiteren 60 Proben handelte es sich um angrenzendes Normalgewebe, das auf das Vorhandensein einer Mutation überprüft wurde. Bei 15 der Patienten fehlen die korrelierenden Normalgewebeproben; von diesen Patienten mit Z.n. Metastasenentfernung, Polyposis coli sowie entzündlichen Darmerkrankungen stand kein operativ asserviertes, nicht pathologisches Material zur Verfügung.

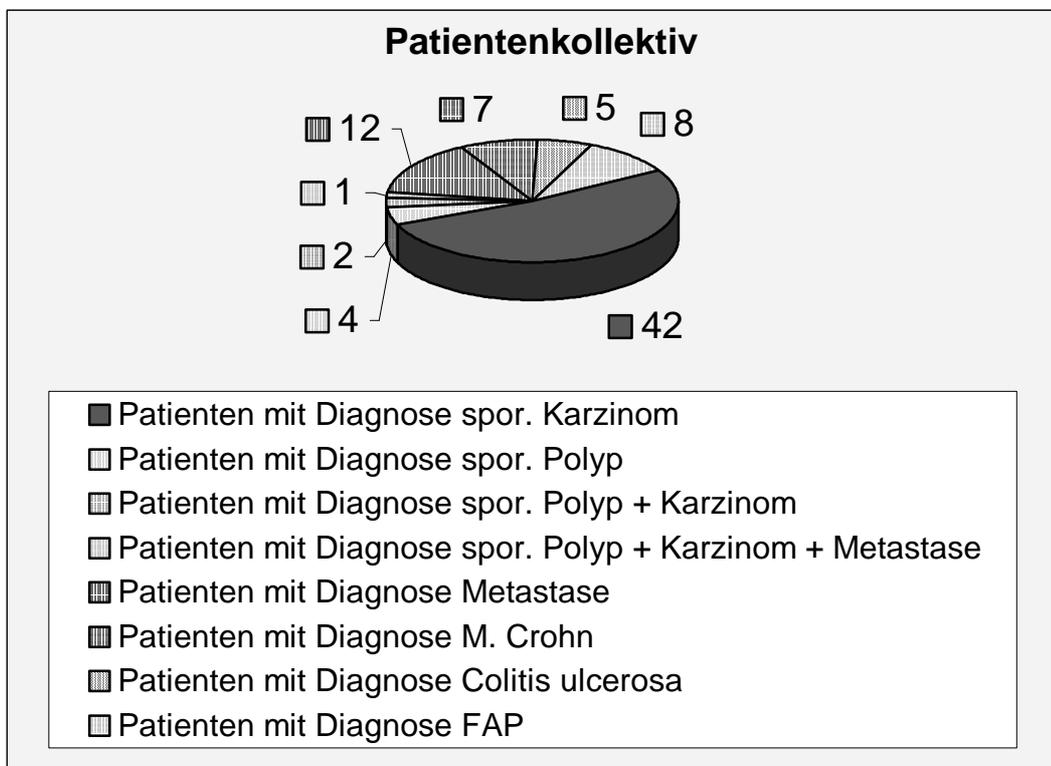


Abb. 14: Anzahl der in die Untersuchung eingeflossenen Patienten unter Aufschlüsselung der Diagnosen.

### **III.1.2 Auswertung der Ergebnisse**

Jede Probe wurde mindestens zweimal untersucht, um auszuschließen, daß falsch positive Ergebnisse durch fehlende oder mangelhafte Verdauung der DNA durch *Bst*N I resultierten.

Bei fraglichen Resultaten (inkomplette Verdauung) wurde die zweite Verdauung der Proben, ggf. mit verändertem Verhältnis der Enzym-Substrat-Menge so oft wiederholt, bis zwei eindeutige Ergebnisse vorlagen (d. h. Einzelbanden bzw. eindeutiges Vorhandensein von zwei gleich starken Banden).

Die Negativkontrollen und Leerproben durften keine Kontamination aufweisen.

### **III.1.3 Statistische Auswertung**

Die Untersuchungen beschränken sich auf empirische Datenerhebung mit vornehmlich deskriptiver Statistik. Aufgrund der geringen Fallzahlen lassen sich Häufigkeiten in der Mutationsfrequenz von *k-ras* nur beschreiben. Aus Praktikabilitätsgründen wurden trotzdem prozentuale Angaben zum besseren Vergleich der einzelnen Patientengruppen gemacht.

	Anzahl	Wildtyp	Mutation	% Mutation
<u>Anzahl der Proben mit pathologischem Befund:</u>	121			
<u>Anzahl der Patienten:</u>	81			
<u>Anzahl der Normalgewebe:</u>	60	59	1	1,7
von Lokalisation:				
Colon	45	44	1	2,2
Leber	3	3	0	0
Milz	1	1	0	0
CEDE	3	3	0	0
FAP (Kolon)	7	7	0	0
FAP (Dünndarm)	1	1	0	0
<u>Anzahl der Patienten mit Diagnose spor. Karzinom:</u>	45			
Proben mit Diagnose spor. Karzinom:	45	29	16	35,6
<u>Anzahl der Patienten mit Diagnose spor. Polyp:</u>	7			
Proben mit Diagnose spor. Polyp:	8	5	3	37,5
<u>Anzahl der Patienten mit Diagnose Metastase:</u>	13			
Proben mit Diagnose Metastase:	16	13	3	18,8
<u>Anzahl der Patienten mit Diagnose M. Crohn:</u>	7			
Proben mit Diagnose M. Crohn:	12	12	0	0
<u>Anzahl der Patienten mit Diagnose Colitis ulcerosa:</u>	6			
Proben entzündlich:	10	10	0	0
Proben mit Diagnose Polyp:	1	1	0	0
Proben mit Diagnose Karzinom:	1	1	0	0
<u>Anzahl der Patienten mit Diagnose FAP:</u>	8			
Proben bei FAP normal	7	7	0	0
Proben mit Diagnose Polyp:	25	17	8	32
Proben mit Diagnose Karzinom:	3	3	0	0
Anzahl der Polypen insgesamt:	34	23	11	32,4
Anzahl der Karzinome insgesamt:	49	33	16	32,7

Tab. 3: Auflistung der untersuchten Gewebeproben unter Aufschlüsselung der bei den Patienten gestellten Diagnose.

### III.1.2 Kolorektale Adenome

Insgesamt wurden 34 kolorektale Adenome untersucht. Hierunter befanden sich 25 Polypen von 8 Patienten mit FAP, 1 Polyp von 1 Patientin mit einer Colitis ulcerosa und 8 sporadisch aufgetretene Polypen von 7 Patienten.

Es zeigte sich hier bei insgesamt 11 Proben das Vorkommen einer Mutation, was einem prozentualen Anteil an *k-ras*-Mutationen von 32,4% entspricht.

Eine Differenzierung der Proben nach der ihr zugrundeliegenden Erkrankung zeigt bei den sporadischen Adenomen unter 8 Proben 3 Mutationen von *k-ras* (37,5%).

25 Proben von 8 Patienten mit einer Polyposis coli enthielten in 32% eine *k-ras*-Mutation.

Dagegen ließ sich bei der Colitis ulcerosa ein Wildtyp für *k-ras* erheben.

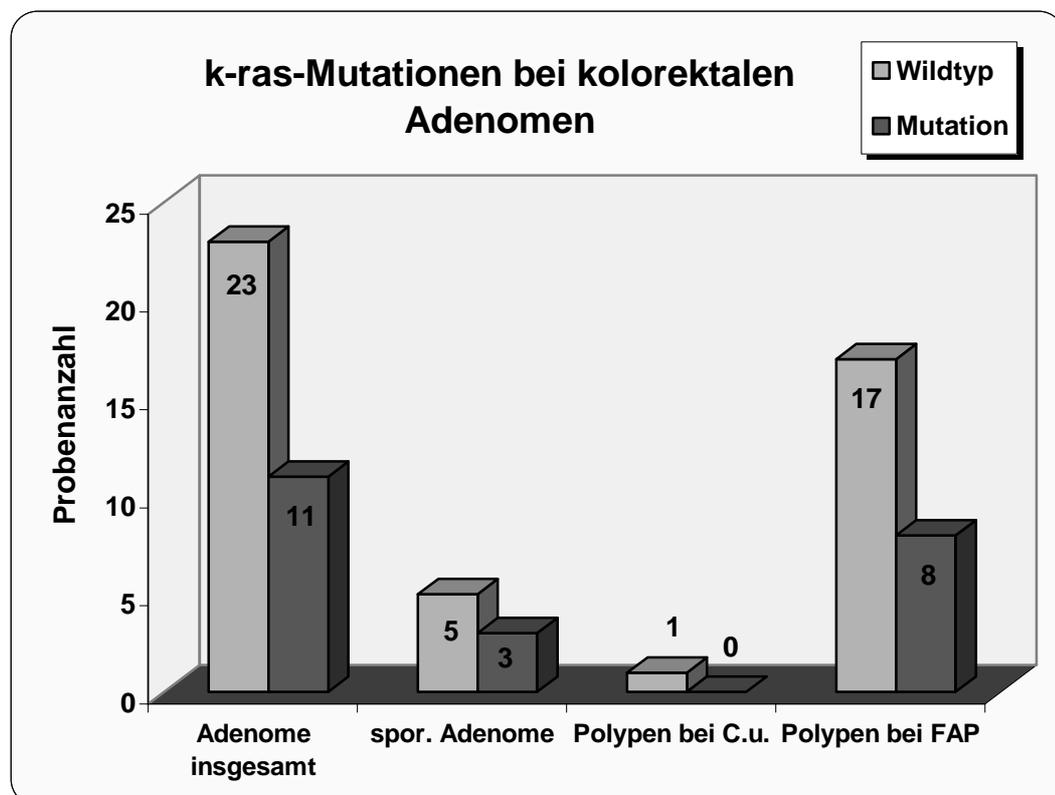


Abb. 15: Verteilung von *k-ras*-Mutationen bei kolorektalen Adenomen unterschiedlicher Krankheitsentitäten

### II.1.2.1 Korrelation der Ergebnisse von sporadischen kolorektalen Adenomen mit den histologischen Befunden

	Anzahl	Wildtyp	Mutation	% Mutation
ITubuläre Adenome	4	3	1	25
IITubulovillöse Adenome	3	2	1	33,3
IIIVillöse Adenome	1	0	1	100

Tab. 4: Aufgliederung der Mutationsfrequenz kolorektaler Adenome unter Berücksichtigung der histologischen Wuchsform

Die Frequenz von Mutationen des *k-ras*-Allels wurde mit der histologischen Differenzierung von sporadischen kolorektalen Adenomen in Beziehung gesetzt.

Tendenziell zeigt sich eine Zunahme von *k-ras*-Mutationen bei histologisch sessiler Wuchsart, die aufgrund der geringen Fallzahl nur deskriptiv sein kann.

### III.1.3 Kolorektale Karzinome

Die insgesamt 49 untersuchten Karzinome setzten sich zusammen aus 45 sporadisch aufgetretenen Karzinomen sowie 3 Karzinomen bei Polyposis coli und 1 Karzinom auf dem Boden einer Colitis ulcerosa.

Bei den sporadischen Karzinomen fanden sich 16 Mutationen von *k-ras* (35,6%).

Die untersuchten Karzinome verursacht durch eine Polyposis coli zeigten dagegen ebenso wie die untersuchte Probe bei Colitis ulcerosa jeweils einen Wildtyp für *k-ras*.

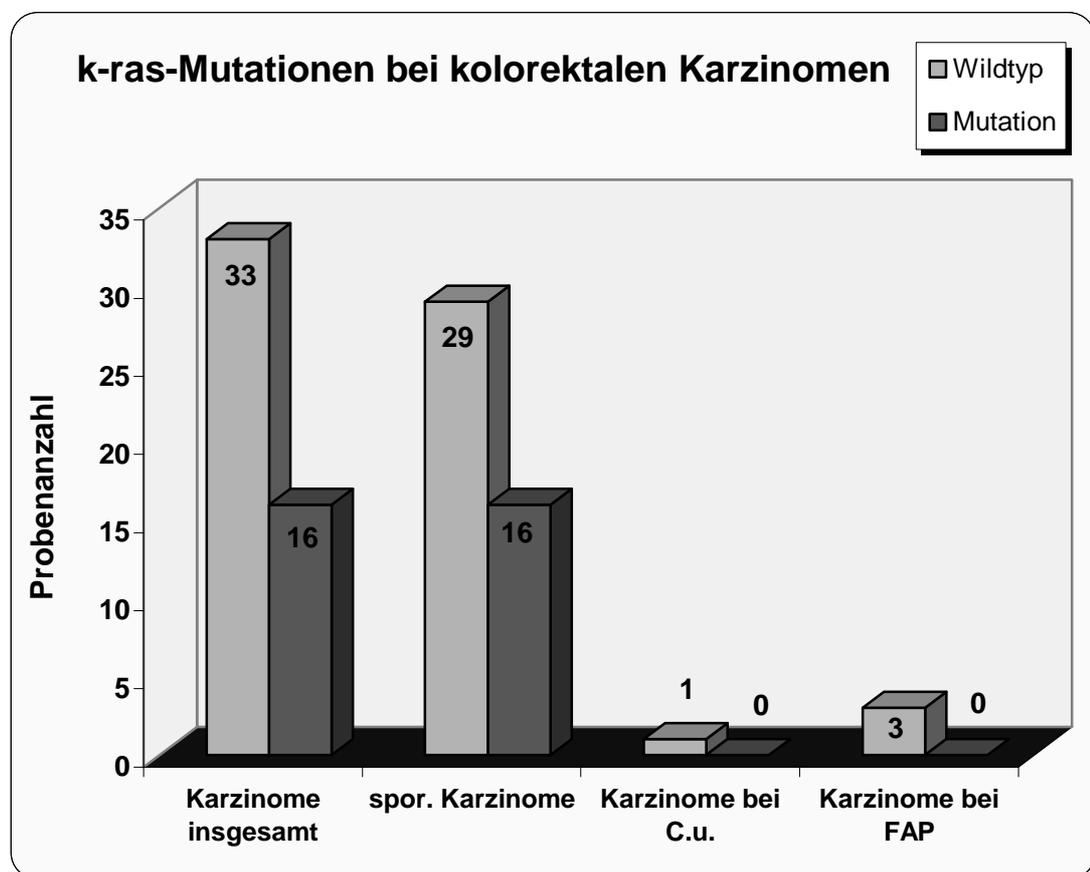


Abb. 16: Verteilung von *k-ras*-Mutationen bei kolorektalen Karzinomen unter Aufschlüsselung der verschiedenen Krankheitsentitäten

### **III.1.3.1 Korrelation der Daten sporadischer kolorektaler Karzinome mit klinischen und histopathologischen Prognosefaktoren**

Die histopathologische Beurteilung der sporadischen Karzinome wurde mit den Ergebnissen der *k-ras*-Mutationen verglichen, um Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung des Genlocus zu ziehen. Zu den Parametern zählen der TNM-Status (T=Tumorausdehnung, N=Nodalstatus, M=Fernmetastasen) sowie das histologische Grading.

Die TNM-Klassifikation erfolgte nach den Richtlinien der UICC, das histologische Grading nach den Graden der Scarff-Bloom-Richardson-Klassifizierung.

Die mathematische Korrelation erfolgte durch einen einseitigen Fischer-Test. Als Signifikanzschwelle wurde  $p = 0,05$  (5%) gewählt.

	n	k-ras		p
		Wildtyp	Mutation	
Alter				
<50 Jahre	5	3	2	0,76 (n.s.)
>50 Jahre	40	26	14	
Summe	45	29	16	
Tumorausdehnung				
T1	1	1	0	0,73 (n.s.)
T2	10	7	3	0,49 (n.s.)
T3	27	17	10	0,73 (n.s.)
T4	5	3	2	
Summe	43	28	15	
LK-Status				
N0	22	14	8	0,77 (n.s.)
N1	7	4	3	0,43 (n.s.)
N2	8	6	2	0,51 (n.s.)
N3	5	3	2	
Summe	42	27	15	
Metastasierung				
M0	36	23	13	0,054 (n.s.)
M1	7	5	2	
Summe	43	28	15	
Grading				
G1	1	1	0	0,65 (n.s.)
G2	28	18	10	0,86 (n.s.)
G2-3	4	2	2	0,90 (n.s.)
G3	10	7	3	
Summe	43	28	15	

Tab. 5: Korrelation der kolorektalen Karzinome mit klinischen und histopathologischen Parametern. (n.s. = nicht signifikant)

Wesentliche Unterschiede im Verteilungsmuster der Mutationen in Abhängigkeit vom Tumorstadium oder der Differenzierung lassen sich nicht erkennen.

### III.1.3.2 Aufgliederung der Mutationsfrequenz nach Tumorlokalisation

	Anzahl	Wildtyp	Mutation	% Mutationen
Zökum	2	0	2	100
Aszendens	3	3	0	0
re. Flexur	1	1	0	0
Transversum	4	2	2	50
Deszendens	0	0	0	0
Sigma	10	4	6	60
Rektum	25	19	6	24
gesamt	45	29	16	35,6

Tab. 6: Mutationsverteilung in Abhängigkeit der Lokalisation

Insgesamt können Mutationen in den weiter proximal gelegenen Darmabschnitten häufiger beobachtet werden. Bei Rektumkarzinomen sind Mutationen deutlich seltener vorhanden.

Faßt man alle proximal des Rektums gelegenen Karzinomproben unter dem Überbegriff Kolonkarzinome zusammen, so stehen 50% Mutationen einer deutlich geringen Mutationsfrequenz von nur 24% bei Rektumkarzinomen gegenüber. Die Berechnung mit dem  $\chi^2$ -Test zeigt jedoch keinen signifikanten Unterschied ( $\chi^2=3,28$ ). Die rechtsseitig gelegenen Tumoren einschließlich der Transversumkarzinome kommen auf eine Mutationsrate von 40%. Die höchste Mutationsrate läßt sich somit mit 60% im Sigma verzeichnen.

### III.1.3.3 Aufgliederung der Mutationsfrequenz nach dem Geschlecht der Patienten

	Wildtyp	Mutation
Weibliche Patienten	8	9
Männliche Patienten	21	7

Tab. 7: Mutationsverteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht

Es zeigt sich eine Häufung der Mutationen bei Patienten weiblichen Geschlechtes. Die Berechnung mittels des  $\chi^2$ -Testes ( $\chi^2=3,604$ ) liegt

unterhalb der Signifikanzschwelle  $p = 0,05$  ( $\chi^2=3,841$ ) und zeigt somit keinen signifikanten Befund.

### III.I.4 Metastasen kolorektaler Karzinome

Es wurden insgesamt 16 Lebermetastasen von 13 Patienten untersucht. Primarien der Lebermetastasen waren allesamt Metastasen sporadischer kolorektaler Tumoren.

Es zeigte sich, daß insgesamt 3 Mutationen von *k-ras* (18,8%) auftraten.

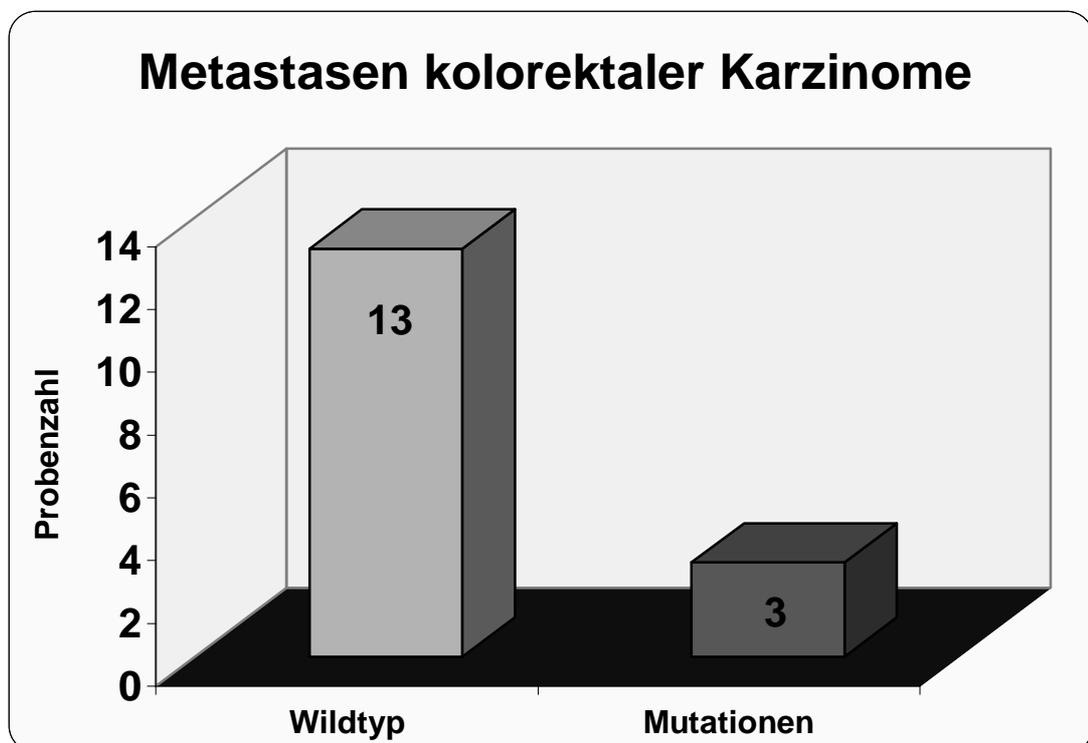


Abb. 17: Anzahl der *k-ras*-Mutationen bei Metastasen sporadischer kolorektaler Karzinome

### III.1.5 Entzündliche Gewebeproben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Insgesamt mituntersucht wurden 22 entzündlich veränderte Gewebeproben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Sowohl 12 Gewebeproben von 7 Patienten mit Morbus Crohn als auch 10 Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa enthielten Wildtyp-*ras*.

Alle Patienten wurden aufgrund von krankheitstypischen Komplikationen einem chirurgischen Eingriff unterzogen. Es waren dies: entzündliche Konglomerattumoren, akute intestinale Blutung, Stenosen, Fistelsysteme, therapieresistente Pankolitis mit in zwei Fällen vorhandenen Dysplasien, sowie oben beschriebenes Karzinom.

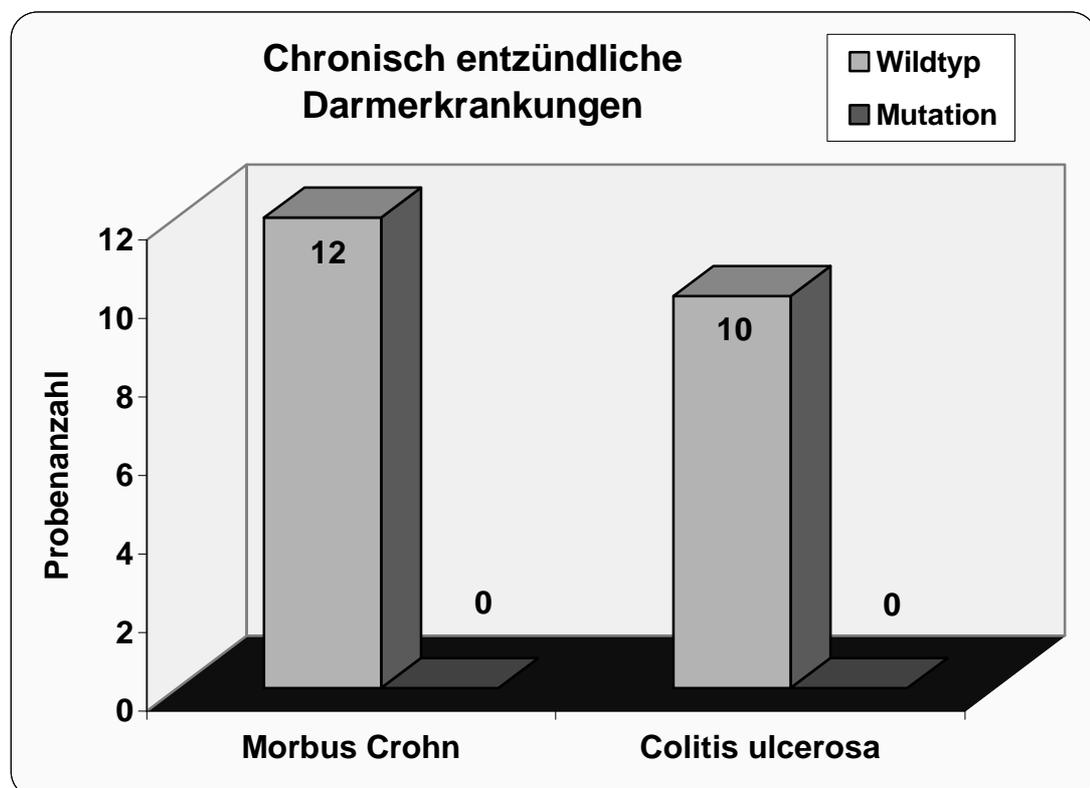


Abb. 18: *k-ras*-Status bei entzündlichen Veränderungen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

### III.1.6 Normalgewebeproben

Von 60 Patienten wurden makroskopisch und mikroskopisch unauffällige Gewebeproben ebenfalls auf das Vorhandensein von *k-ras*-Mutationen untersucht.

Gewonnen wurden 57 der Proben aus angrenzenden, tumorfreien Kolonabschnitten, eine Probe aus dem Dünndarm eines Patienten, sowie 2 Proben aus Lebergewebe von Patienten mit Lebermetastasen.

Nur in einer der untersuchten Normalgewebeproben, die aus unmittelbar an ein Karzinom angrenzender Kolonschleimhaut stammt, ließ sich eine *k-ras* Mutation nachweisen.

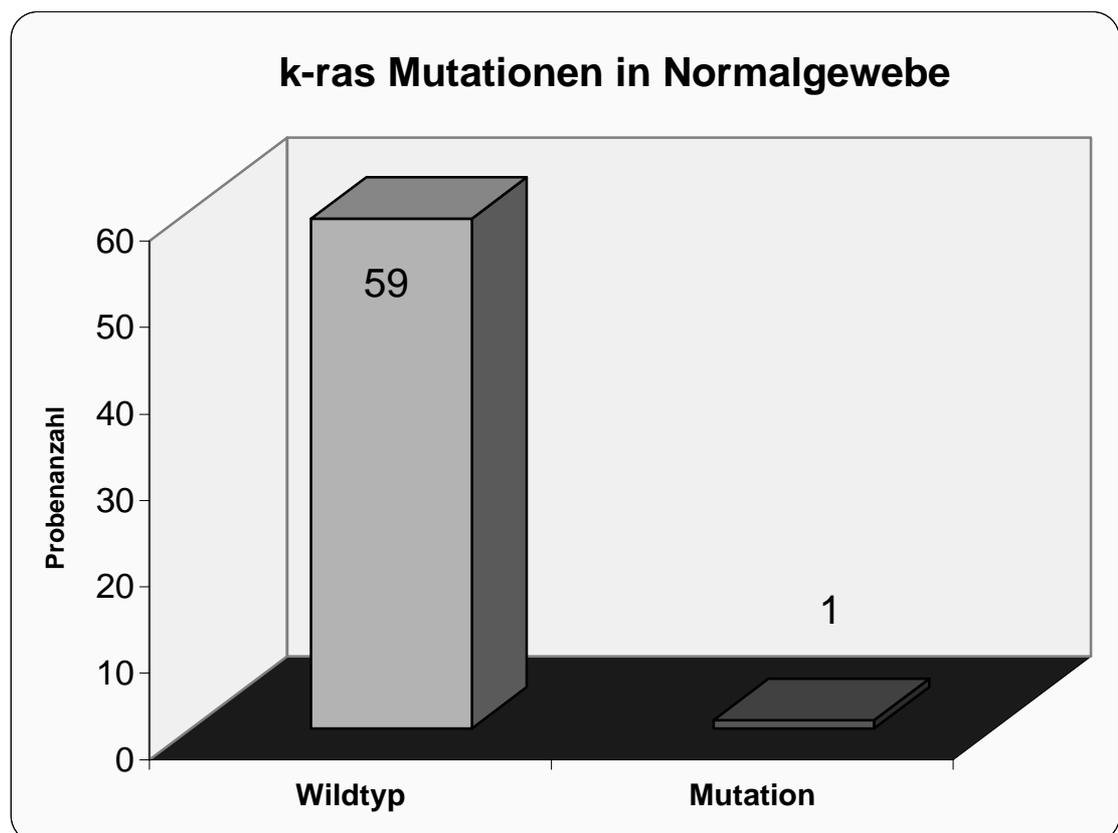


Abb. 19: *k-ras* Status in an kolorektale Karzinome angrenzendem Normalgewebe

## **III.2 E-Cadherin**

### **III.2.1 Patientengut**

Das untersuchte Material entstammte 14 Patienten mit sporadischen kolorektalen Karzinomen. Das untersuchte Gewebe umfaßte jeweils Karzinomgewebeproben als auch normales Kolongewebe der Patienten als Negativkontrolle. Zur Etablierung der Methode wurde die Zelllinie KATO III mit bekannter Mutation des E-Cadherin-Gens an Exon 7 als Positivkontrolle gewählt.

### **III.2.2 Untersuchungsumfang**

Untersucht wurden die Exons 6 – 10 von E-Cadherin. Diese kodieren für den extrazellulären Anteil des Proteins, wofür die Tendenz der Akkumulation von Mutationen in diesem Bereich zumindest bei lobulären Mammakarzinomen zu bestehen schien (BERX *et al.*, 1995).

### **III.2.3 Auswahl der Untersuchungsbedingungen**

Zur Etablierung der Methode wurden Gele unterschiedlicher Kontextur überprüft. Es wurden Untersuchungsreihen mit verschiedenen Glycerolkonzentrationen sowie Zufügen von Urea durchgeführt. Weiterhin wurden alle Ansätze sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C gefahren.

Nach Analyse der getesteten Gelvarianten wurde als Standard ein Gel mit 10% PAA und 5% Glycerol festgelegt. Hierbei konnte unter beiden Temperaturbedingungen die bekannte Mutation der Zelllinie KATO III gut identifiziert werden.

### **III.2.4 Einschlußkriterien**

Einschlußkriterien der Patienten in die Studie waren das familienanamnestisch gesicherte sporadische Vorkommen und ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit zumindest bestehender Lymphknotenfilialisierung sowie möglichst niedrige Tumordifferenzierung. Bei einem Patienten bestand ein Siegelringkarzinom. Das histologische Staging der Patienten kann den folgenden Tabellen entnommen werden:

<b>Tumorstadium:</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Lymphknotenstatus:</b>	<b>Anzahl</b>
T1	0	N0	1
T2	1	N1	8
T3	12	N2	4
T4	1	N3	1
<b>Metastasierung:</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Grading</b>	<b>Anzahl</b>
M0	9	G2	5
M1	5	G2-3	4
		G3	5

Tab. 7: Gliederung der Gewebeproben nach Tumorstadium und Differenzierungsgrad

	<b>Tumorlokalisation</b>	<b>Staging/Grading</b>
Patient 1	Aszendenskarzinom	pT3 pN1 M0 G2-3 R0
Patient 2	Rektumkarzinom	pT3 pN1 M0 G2-3
Patient 3	Flexurenkarzinom rechts	pT3 pN1 M0 G2-3 R0
Patient 4	Sigmakarzinom	pT3 pN1 pM1 G3 R2
Patient 5	Sigmakarzinom	pT4 pN0 M0 G3
Patient 6	Sigmakarzinom	pT3 pN1 M0 G2
Patient 7	Sigmakarzinom	pT3 pN1 pM1 G3
Patient 8	Rektumkarzinom	pT3 pN1 M0 G2
Patient 9	Rektumkarzinom	pT3 pN3 pM1 G3
Patient 10	Transversumkarzinom	pT3 pN2 pM1 G2-3
Patient 11	Rektumkarzinom	pT3 pN2 M0 G2
Patient 12	Sigmakarzinom	pT3 pN2 pM1 G3
Patient 13	Rektumkarzinom	pT2 pN1 M0 G2
Patient 14	Zökumkarzinom	pT3 pN2 M0 G2

Tab. 8: Auflistung der Patienten nach Aufschlüsselung der Tumorlokalisation sowie der Tumorstadien

### III.2.5 Auswertung

Alle ausgewerteten Gele ließen die als Positivkontrolle mitgeführte Mutation in Exon 7 der Zelllinie Kato III erkennen. Eine Mutation im Bereich der hier untersuchten Exons 6 bis 10 konnte bei keiner der Patientengewebe nachgewiesen werden.

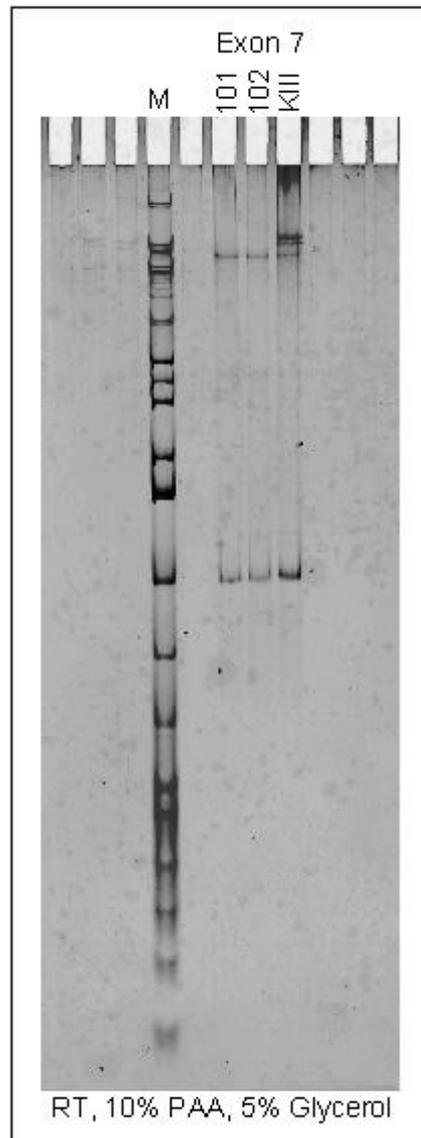


Abb. 20: Nachweis der Mutation von E-Cadherin in Exon 7 der Zelllinie Kato III

## **IV. Diskussion**

### **IV.1 k-ras**

#### **IV.1.1 Auswahl des Materials und Erörterung der Methodik**

Eine herausragende Entdeckung in der Tumorforschung war die Identifikation spezifischer Punktmutationen.

Damit aus einem *ras*-Protooncogen ein transformierendes Oncogen entsteht, genügt ein einziger Basenaustausch (Bos *et al.*, 1985). Diese wurden bei menschlichen Tumoren meist in den Positionen 12, 13 oder 61 der drei Untergruppen *c-Ha-ras*, *c-Ki-ras* und *N-ras* gefunden (Bos *et al.*, 1985, VARMUS, 1984). Die Punktmutationen an den Codons 12 und 13 verändern das Protein im Bereich der GTP-Bindungsdomäne, während Codon 61 im Bereich der GTPase-Region liegt. Beide Mutationen verhindern die Hydrolyse von GTP zu GDP. Ein (seltener) Austausch der Aminosäuren 116 bis 119 hingegen bewirkt eine erhöhte Guaninnukleotid-Austauschrate.

Auf dem Boden dieser Beobachtungen erschlossen sich neue diagnostische Möglichkeiten mit im Verhältnis geringem Zeitaufwand wie die hier verwandte RFLP.

#### IV.1.2 Sensitivität der Methode

LEVI *et al.* (1991) zeigen, dass biochemische Assays in der Lage sind, *ras*-Mutationen zu detektieren, wenn mindestens 0,2% der zu testenden Zellen eine Mutation enthalten, entsprechend der Detektion eines mutierten Allels unter 1000 Wildtypallelen. Dies bedeutet eine deutlich erhöhte Sensitivität im Vergleich zur direkten Sequenzierung nach Amplifikation oder beispielsweise anderer Nachweisverfahren wie der Oligonukleotid-hybridisierung (Bos *et al.*, 1984) oder des RNase-mismatch-cleavage-assay (WINTER *et al.*, 1985), für die sich die Detektion mutierter Zellen auf eine mutierte Zelle unter drei normalen Zellen beschränkt (FINKELSTEIN *et al.*, 1993).

#### **IV.1.3 Fehlermöglichkeiten der Methodik oder bei der Interpretation**

Untersuchungsmethoden, die sich der PCR bedienen, sind nicht in der Lage zwischen Mutationen in einer kleinen Unterpopulation von Zellen oder Mutationen durch Fehleinbau der *Taq* DNA Polymerase zu unterscheiden. CHEN *et al.* (1991) fanden eine kumulative Fehlerfrequenz für die *Taq* DNA Polymerase von einer Codon 12 Mutation pro  $2 \times 10^4$  Molekülen des totalen Amplifikationsproduktes. Diese *Taq* DNA Polymerase-bedingten Mutationen präsentieren einen konstanten Anteil des Amplifikationsproduktes in jeder Stufe der PCR. Die erhobenen Ergebnisse führten zu der Entwicklung des auch von mir verwandten 2-Step-Assays, in dem die Anzahl der Zyklen niedrig gehalten wurde und Moleküle mit der bestehenden Codon 12 Mutation selektiv im zweiten Schritt amplifiziert wurden (LEVI *et al.*, 1991).

Sehr spezifische Verfahren basierend auf der Sequenzierung des gesamten Genes aus ausgesuchten Tumorarealen (BURMER *et al.*, 1989, 1991) zeigten eine reelle Mutationsfrequenz des *k-ras*-Genes von 50-60%. Mit dem zur Anwendung gekommenen Verfahren wurden durch die selektive Testung nur der ersten beiden Positionen von Codon 12 mögliche Mutationen im Bereich der Codons 13 und 61 sowie der Codons 12, 13 und 61 von *N-ras* vernachlässigt. Diese können für bis zu 12% aller *ras*-Mutationen bei kolorektalen Karzinomen verantwortlich gemacht werden (VOGELSTEIN *et al.*, 1988).

Durch die elektive Untersuchung von Codon 12 kann somit nur eine approximative Aussage bezüglich des molekularbiologischen Status gemacht werden.

Ein Beispiel wurde publiziert, in dem ein Kolonkarzinom Wildtypallele von *k-ras* enthielt, die jedoch durch eine Mutation eines anderen Mitgliedes aus der *ras*-Signalkette, dem Neurofibromatosis 1 Gen, aktiviert wurden (LI *et al.*, 1992). Es ist somit möglich, daß Kolonkarzinome mit Wildtypallelen für *k-ras* ein ähnliches klinisches Verhalten wie solche mit einer Mutation aufweisen, weil die Signalkette, in die die *ras*-Protoonkogene involviert sind, auch durch andere Faktoren aktiviert werden kann.

Die modifiziert nach LEVI *et al.* (1991) angewandte Untersuchungsmethode ist so gestaltet, daß durch eine Punktmutation an den ersten beiden Positionen von Codon 12 die hier ursprünglich für das Restriktionsenzym BstN1 bestehende Schnittstelle entfällt. Sicherer in ihrer methodischen Beurteilbarkeit sind Verfahren, bei denen durch die Mutation eine zusätzliche Schnittstelle eingeführt wird. Hierdurch wird dann erst eine Doppelbande sichtbar, während bei der hier gewählten Methode eine Doppelbande auch durch eine nur inkomplette Verdauung zustande kommen kann. Um Fehlmessungen in diesem Bereich zu vermeiden, wurde die Messung generell zweimal durchgeführt und bei nicht eindeutigen Ergebnissen (obere Bande schwächer als untere) mit verschiedenen Enzymkonzentrationen und Verdauungszeiten wiederholt, bis zwei eindeutige Ergebnisse vorlagen.

## IV.1.4 Sporadische kolorektale Adenome und Karzinome

### IV.1.4.1 Mutationsfrequenz

In der Literatur sind bei 40 bis 50% aller kolorektalen Karzinome Mutationen des *K-ras*-Gens beschrieben (Bos *et al.*, 1987, VOGELSTEIN *et al.*, 1988, PERUCHO *et al.*, 1989, FORRESTER *et al.*, 1987, CAPELLA *et al.*, 1991, BURMER *et al.*, 1989, 1991). Aktivierende Mutationen in den Codons 12 und 13 von *K-ras* werden vor allem bei Karzinomen sowie bei Adenomen mit einem Durchmesser größer 1 cm beobachtet (VOGELSTEIN *et al.*, 1988).

Mit 37,5% beziehungsweise 35% liegen die erhobenen Werte für sporadische kolorektale Adenome und Karzinome unter diesen Angaben, wobei sich z.B. die hohe von Vogelstein geschilderte Mutationsrate auf alle *ras*-Mutationen insgesamt bezieht. Gliedert man die Karzinomproben allerdings in Kolon- und Rektumkarzinome auf, so liegt bei den Kolonkarzinomen mit 50% *k-ras*-Mutationen im Vergleich zu nur 24% bei Rektumkarzinomen ein deutlich (jedoch nicht signifikant) häufigeres Auftreten vor. Die untersuchten Sigmakarzinome stehen den Rektumkarzinomen sogar mit einer Mutationsfrequenz von 60% für *k-ras* gegenüber.

Diese Daten decken sich mit den Angaben von MORRIN *et al.* (1994), die ebenfalls eine deutliche Wichtung von *k-ras*-Mutationen von 52% für linksseitige Tumoren im Vergleich zu nur 33% bei Rektumkarzinomen beschrieben. Weiterhin verzeichneten sie nur bei 18% der rechtsseitigen Tumoren eine Mutation von *k-ras*. Hierin decken sich meine Daten allerdings nicht; faßt man die rechtsseitigen Karzinome zusammen, so liegen sie mit einer Mutationsrate von insgesamt 40% deutlich höher. Aufgrund der niedrigen Fallzahl können meine Daten allerdings nur deskriptiv sein.

HERMANEK *et al.* (1983) zeigten, daß die Malignitätsrate durch eine zunehmende Adenomgröße wie auch durch die Kombination von Größe und histologischer Differenzierung beeinflusst wird. Der Einfluß der Größe auf die Malignitätsrate scheint hierbei für tubuläre und tubulovillöse Adenome größer zu sein als für villöse Adenome. Die generelle Malignitätsrate adenomatöser

Polypen steht mit 5% einer Malignitätsrate von 40% bei villösen Adenomen gegenüber; die Malignitätsrate tubulovillöser Tumoren steht den villösen Adenomen näher (MORSON, 1976). Wie gezeigt, können in den Adenomtypen mit aggressiverem Wachstumsmuster k-ras-Mutationen häufiger nachgewiesen werden.

#### **IV.1.4.2 Tumorstadium**

Tumorstadium und Tumordifferenzierung konnten von den meisten Autoren nicht mit dem Auftreten von k-ras in einen Kontext gebracht werden (FORRESTER *et al.*, 1987, MORRIN *et al.*, 1994). Lediglich von FINKELSTEIN *et al.* (1993) wurden höhere Mutationsraten bei T3- und T4-Tumoren (42% versus 30% bei T<sub>is</sub>-, T1- und T2-Tumoren) beschrieben, die aber als nicht signifikant eingestuft wurden.

In den in dieser Arbeit untersuchten Tumoren steht eine Mutationshäufigkeit von k-ras von insgesamt 27% bei T1- und T2-Tumoren 37,5% bei T3- und T4-Tumoren gegenüber, die allerdings auch nicht signifikant ist ( $p = 0,41$ ). Eine signifikante Zunahme von k-ras-Mutationen mit Abnahme der Tumordifferenzierung konnte ebenfalls nicht verzeichnet werden.

#### **IV.1.4.3 Entwicklung des ras-Status im Laufe des Tumorprogresses**

Eine Reihe von Untersuchungen beschäftigen sich mit dem zeitlichen Auftreten von k-ras-Mutationen und ihrem Verhalten im Laufe des weiteren Tumorprogresses. Die hierzu veröffentlichten Daten stellen sich in einigen Punkten sehr gegensätzlich dar.

Bei Adenomen unter 1 cm ist die Mutationsrate relativ gering (VOGELSTEIN *et al.*, 1988). Es wird daher diesem Onkogen eine Rolle im Rahmen des Tumorprogresses zum Karzinom zugeschrieben (SHIBATA *et al.*, 1993).

Meine Daten ergeben eine Abnahme der Mutationsfrequenz mit zunehmendem Tumorprogress von 37,5% Mutationen des *k-ras*-Gens bei sporadischen kolorektalen Adenomen über 35% bei Karzinomen und einer Frequenz von nur 19% Mutationen bei untersuchten Metastasen.

Zwei mögliche Ursachen wären diesbezüglich zu diskutieren:

#### **a. Verlust des die *k-ras*-Mutation beinhaltenden Zellklons im Laufe des Tumorprogresses**

Für kolorektale Adenome wird eine Tumorerogenität beschrieben. Topografische Untersuchungen zeigen die Beschränkung von aktiviertem *k-ras* auf einzelne Zellareale innerhalb des Adenoms. Während des Adenomstadiums scheint eine Phase mit multiplen Zellklonen zu existieren, aus der sich ein Klon herauskristallisiert und den weiteren Tumorprogress bedingt (SHIBATA *et al.*, 1993).

Die Entwicklung von Karzinomen könnte nach Vermutungen KOPNINS (1993) aus adenomatösen Zellvarianten, denen die *ras*-Mutation fehlt oder durch Überwucherung eines Klons, der während des Progresses mutierte *ras*-Allele verloren hat, erfolgen.

#### **b. *De novo* Karzinomentstehung**

Die niedrigere Rate an Mutationen des *k-ras*-Gens bei Karzinomen im Vergleich zu Adenomen (VOGELSTEIN *et al.*, 1988) sowie die nachgewiesene Konstanz von *k-ras*-Mutationen innerhalb adenomatöser und karzinomatöser Anteilen eines Tumors (KOPNIN, 1993) läßt sich ebenso durch eine *de novo* Karzinomentstehung unter Umgehung des Adenomstadiums erklären.

In diesem Zusammenhang interessant sind Veröffentlichungen, die eine höhere Mutationsfrequenz von *k-ras* bei polypoidem als bei ulzerativem Tumorwachstumsmuster beschreiben. Diese Resultate waren sowohl für sporadische kolorektale Karzinome als auch (in eingeschränkter Zahl) bei

Karzinomen auf dem Boden einer Colitis ulcerosa nachweisbar (YAMAGATA *et al.*, 1995). Ebenso wurden bei flat adenomas weniger mutierte *ras*-Allele gefunden als bei polypoiden Adenomen (YAMAGATA *et al.*, 1994). Die mögliche Entstehung nicht-polypöser Tumoren aus flat adenomas wurde anhand dieser Daten gemutmaßt.

Es liegen somit Hinweise für die Existenz verschiedener alternativer Entwicklungsmodi in der Tumorentwicklung vor.

#### **IV.1.4.4 Mutationsverhalten des individuellen Tumors**

In einer Reihe von Veröffentlichungen wird versucht, Klärung über den Mutationsnachweis im Laufe des Tumorprogresses des individuellen Tumors zu erhalten.

Mittels topografischer Gewebeselektion wurden verschiedene Areale innerhalb derselben Tumoren auf das Vorliegen von *k-ras*-Mutationen überprüft. FINKELSTEIN *et al.* (1993) beschrieben die Limitation von *k-ras*-Mutationen innerhalb eines Malignoms auf eine spezifische Mutation. MOERKERK *et al.* (1994) konnten hingegen innerhalb einzelner Tumoren bis zu drei verschiedene Punktmutationen in Codon 12 nachweisen, die mit progredientem (Dukes C > Dukes B) Tumorstadium zunahmen. Die Multiplizität von Mutationen wurden von ihnen als Zeichen des Tumorprogresses betrachtet.

Mutierte *ras*-Allele wurden in kolorektalen Metastasen nur dann entdeckt, wenn auch der Primärtumor über die gleiche Mutation verfügte (FINKELSTEIN *et al.*, 1993). Dies würde die These des frühzeitigen Auftretens von *k-ras* Mutationen während der Tumorigenese unterstützen.

LOSI *et al.* (1992) konnten in Untersuchungen an Rezidivtumoren in allen Fällen die in den Primären schon nachgewiesenen Mutationen bestätigen und zeigten, daß die Tumoren, die initial Wildtypallele für *k-ras* enthielten, diese auch im weiteren Tumorprogress behielten. FINKELSTEIN *et*

*al.* (1993) dagegen fanden für Rezidivtumoren eine signifikant niedrigere Mutationsrate als bei Primarien, BENHATTAR *et al.* (1993) veröffentlichten genau reziproke Daten.

Weiterhin sollen Mutationen häufiger in hämatogen metastasierten Kolonkarzinomen als in kurativ resezierten Primarien auftreten (FINKELSTEIN *et al.*, 1993). Dagegen stehen die Daten dieser Arbeit, die eher eine leichte Erniedrigung von *k-ras* Mutationen bei metastasierten Tumoren zeigen. Nicht lymphogen metastasierte Tumoren sind zu ungefähr gleichen Anteilen wie solche mit positivem Nodalstatus (36% vs. 35%) von *k-ras*-Mutationen betroffen.

#### **IV.1.4.5 Positionsspezifität von Mutationen**

Mutationen im Bereich der ersten Position von Codon 12 wurden gehäuft bei Karzinomen im Anfangsstadium, Mutationen an der zweiten Position von Codon 12 dagegen bei fortgeschrittenen Stadien beobachtet (FORRESTER *et al.*, 1987, ROCHLITZ *et al.*, 1993). Diese Positionsspezifitäten konnten aber in Kontrollstudien nicht belegt werden (BOS, 1989).

Gegensätzliche Äußerungen gibt es auch bezüglich des klinischen Verhaltens in Abhängigkeit der Position der Mutation. FINKELSTEIN *et al.* (1993) vermuten, daß Tumoren mit Codon 13 Mutationen nicht metastasieren, und daß solche mit Codon 12 Valin-Mutationen nur Lymphknotenfiliae verursachen würden. Diese Daten werden durch die Ergebnisse von MARKOWITZ *et al.* (1995) nicht unterstützt.

G-A-Transitionen in Codon 12 wurden ausschließlich in Dukes B-Tumoren nachgewiesen, G-T Transversionen vor allem in Dukes C- Stadien und G-C Transversionen ausschließlich in Dukes C-Stadien. G-T- und G-C-Transversionen wurden als assoziierbar mit metastasierendem Verhalten gedeutet, T-A-Transitionen dagegen nicht (MOEKERK *et al.*, 1994).

#### **IV.1.4.6 Prognosefaktoren**

Es liegt nahe, die Variabilität in der Tumoraggressivität, einschließlich dem Auftreten und dem Muster von Metastasen, zumindest teilweise mit genetischen Veränderungen in Verbindung zu bringen.

Das *k-ras* Gen als häufig zu beobachtende molekularbiologische Veränderung bei kolorektalen Karzinomen wurde daher in einer Reihe von Veröffentlichungen mit den unterschiedlichsten Faktoren korreliert, mit der Intention, individualisierte Therapieansätze und Prognosefaktoren aus dem Mutationsmuster zu entwickeln (FINKELSTEIN *et al.*, 1993).

Signifikante Korrelationen zwischen dem Auftreten von *k-ras*-Mutationen und dem Alter, Geschlecht oder der Rasse der Karzinompatienten ebenso wie der anatomischen Lokalisation der Tumoren wurden von den meisten Autoren verneint und als Indiz für die somatische Natur der *ras*-Gen-Mutationen gewertet (FORRESTER *et al.*, 1987, BOS *et al.*, 1987, VOGELSTEIN *et al.*, 1988).

Dagegen fanden BREIVIK *et al.* (1994) signifikante Korrelationen zwischen Alter, Geschlecht und Lokalisation der Tumoren. Bei jüngeren Patienten traten Mutationen bei Kolonkarzinomen häufiger bei weiblichen Patienten auf, in höherem Alter fand sich eine gegenläufige Konstellation. Bei Rektumkarzinomen stellten sich diese Befunde genau umgekehrt dar.

Diese Befunde werden von ihm auf unterschiedliche Stuhlkomposition je nach Alter und Geschlecht in Verbindung mit unterschiedlichen Hormonspiegeln zurückgeführt.

Nach Durchsicht unserer Ergebnisse in dieser Hinsicht zeigte sich tatsächlich eine Häufung der Mutationen bei Kolonkarzinomen des weiblichen Geschlechts, die allerdings als nicht signifikant zu werten ist.

#### **IV.1.4.7 Überlebenszeit**

Studien an nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zeigen, daß die Gegenwart von *k-ras* Mutationen einen signifikanten negativen prognostischen Faktor sowohl für das krankheitsfreie- als auch das Gesamtüberleben darstellt (SLEBOS *et al.*, 1990).

Im Gegensatz hierzu wurden bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen in mehreren Studien keine Unterschiede zwischen 5-Jahres-Überlebensraten und Mutationen des *k-ras*-Onkogens gesehen (MARKOWITZ *et al.*, 1995; MORRIN *et al.*, 1994, KERN *et al.*, 1991; LAURENT-PUIG *et al.*, 1992; BELL *et al.*, 1993).

Allerdings konnten für Kolon- und Bronchialkarzinomzelllinien unterschiedliche Punktmutationen an Codon 12 nachgewiesen werden (CAPON *et al.*, 1983).

#### **IV.1.4.8 Ansprechen auf eine Chemotherapie**

In Untersuchungen an Zelllinien standen mutierte *ras*-Allele in direktem Zusammenhang mit Chemoresistenz vor allem von Cisplatin wie auch mit ionisierender Strahlung (SKLAR, 1988a u. b). Weiterhin scheinen sie die Expression mehrerer Chemoresistenzgene zu fördern (CHIN *et al.*, 1992; BURT *et al.*, 1988).

Klinische Studien konnten allerdings keine Hinweise auf das Ansprechen einer Chemotherapie bei Patienten mit CRC in Abhängigkeit des *k-ras*-Status geben (MARKOWITZ *et al.*, 1995).

Der Rahmen dieser Arbeit beschränkte sich auf die molekularbiologische Statuserhebung. Der weitere Krankheitsverlauf der betroffenen Patienten wurde nicht verfolgt, so daß keine Aussagen bezüglich der Prognose oder des Ansprechens auf weitere Therapiemaßnahmen gemacht werden können.

Zusammenfassend scheint eine Mutation von *k-ras* ein frühes Ereignis im Rahmen der Tumorigenese darzustellen. Ob eine *ras*-Mutation im Laufe des Tumorprogresses konstant bestehen bleibt oder verloren geht, ist anhand statischer Untersuchungen nur schwer eruierbar. Prognostische Hinweise lassen sich aus dem Mutationsmuster nicht erheben.

Letztlich führen bei einem durchschnittlichen Mutationsnachweis von 40-50% immer auch andere Mechanismen zur Ausbildung eines Malignoms, so daß alternative Wege der Tumorigenese postuliert und weiter erforscht werden müssen.

#### IV.1.5 *K-ras*-Mutationen in histologisch normaler Mukosa

Eine ganze Reihe von Studien beschäftigen sich mit dem zeitlichen Auftreten von *k-ras*-Mutationen. Untersuchungen von adenomatösen und karzinomatösen Anteilen innerhalb eines sporadischen kolorektalen Tumors wiesen auf das Auftreten von Mutationen vor Entwicklung des Malignoms hin (Bos *et al.*, 1987).

BURMER *et al.* (1989) wiesen Mutationen in kolorektalen Adenomen und Karzinomen sowohl in diploiden als auch aneuploiden Zellen nach. Sie deuten die vor der Veränderung der Ploidität entstehenden Mutationen als Indiz für ein frühes Auftreten der *k-ras*-Mutationen, hinweisend auf das mögliche Vorkommen von Mutationen in histologisch normaler Mucosa in der Umgebung von Karzinomen. Ein Umfeld genetisch abnormaler Mucosa könnte auch im Rahmen der Entstehung eines Lokalrezidivs eine Rolle spielen.

Vorteile einer Detektion von *k-ras*-Mutationen in augenscheinlich gesundem Gewebe wären eine noch frühzeitigere Diagnostikmöglichkeit noch vor dem Auftreten histologischer Veränderungen (RONAI, 1992).

Zu diskutieren wäre hierbei der Krankheitswert einer *k-ras*-mutierten Zelle. Hierzu existieren keine aussagefähigen Studien. Tierexperimentelle Untersuchungen an Mammakarzinomen karzinogenexponierter Ratten geben Hinweise, daß das Auftreten von *ras*-Mutationen nicht immer zur Entwicklung von Tumorzellen führt (RONAI *et al.*, 1991). KUMAR *et al.* (1990) konnten in einem ähnlichen Experiment zeigen, daß Brustdrüsen mit bestehender *k-ras*-Mutation so lange keine Tumoren entwickeln, wie die Exposition mit Östrogenen verhindert wird.

Ebenfalls in Tierversuchen wurde demonstriert, daß Mutationen des *k-ras*-Onkogenes bis zwei Monate vor dem Auftreten einer Neoplasie nach erfolgter Karzinogenexposition erfolgen können (KUMAR *et al.*, 1990). Die mutierten Onkogene scheinen latent vorhanden sein zu können, wobei ein

zusätzlicher Faktor zur Triggerung der neoplastischen Weiterentwicklung nötig zu sein scheint (KUMAR *et al.*, 1990).

Diese Hinweise auf eine irreversible Initiation durch *ras* bei fehlender alleiniger Fähigkeit zur weiteren Promotion (KUMAR *et al.*, 1990) sind gut vereinbar mit dem Modell der Multi-Step-Karzinogenese. Das Auftreten einer *ras*-Mutation muß also nicht zwangsläufig in der Ausbildung eines Tumors münden.

Fragwürdig bleiben somit die sich aus einem positiven Untersuchungsergebnis für *k-ras* in histologisch unauffälliger Kolonschleimhaut ergebenden therapeutischen Konsequenzen.

#### **IV.1.5.1 Das Phänomen der „field cancerisation“**

Grundlegend für die Detektion mutierter *k-ras* Allele in augenscheinlich normalem Gewebe scheint eine sehr sensitive Untersuchungsmethode wie die enriched PCR (MINAMOTO *et al.*, 1995) oder die hierbei verwandte 2-Step-RFLP (AIVADO *et al.*, 2000). Nachteil dieser PCR-gestützten Untersuchungsmethoden ist hierbei die oben beschriebene Fehlerquote der *Taq*-Polymerase.

Wenige Autoren berichteten über das Auftreten von *k-ras*-Mutationen in mikroskopisch normaler Mucosa aus der Nachbarschaft kolorektaler Karzinome. Diese wurden als Mikrometastasierung (lokoregionäre Metastasierung von einem Tumorklon, der in der Umgebung multiple Läsionen setzt) oder sogenannte „field cancerization“ (multiple genetische Veränderungen in benachbarten Mukosazellen) gedeutet.

Diesen Studien lagen meist nur eine sehr geringe Anzahl an Normalgewebeproben zugrunde. AIVADO *et al.*, (2000) fanden 4 *k-ras*-

Mutationen in 18 untersuchten Mucosaprobe; ZHU *et al.* (1997) beschrieben 6 Mutationen in 10, MINAMOTO *et al.* (1995) 14 von 70, RONAI *et al.*, (1994) 2 von 14, MELTZER *et al.* (1990) 2 von 6, BURMER *et al.* (1989) 2 Mutationen von 10 untersuchten Proben histologisch unauffälliger Darmschleimhaut. FORRESTER *et al.* (1987) dagegen konnten in 10 untersuchten Proben von an ein kolorektales Karzinom angrenzenden Normalgeweben mit Hilfe der weniger sensitiven RNase A mismatch cleavage analysis keine Mutationen nachweisen.

In dieser Studie wurde mit 60 Normalgewebeproben ein im Vergleich zur Literatur relativ umfangreiches Probenkollektiv untersucht.

Bei sorgfältiger Präparation und Auswertung der Proben ließen sich nur in einem der 60 mituntersuchten Normalgewebeproben Anhalte für eine sogenannte „Field-Cancerisation“ oder eine Mikrometastasierung finden. In diesem Fall konnte die Mutation ebenso in dem angrenzenden Rektumkarzinom nachgewiesen werden.

In den in der oben erwähnten Literatur untersuchten Normalgewebeproben spiegelte die Gegenwart mutierten *k-ras* nicht immer die molekularbiologische Situation im Bereich der Tumoren wieder. Als Ursache diskutiert wurden diesbezüglich *de novo* Mutationen, verursacht durch unterschiedliche ätiologische Faktoren und Zeitpunkte (MINAMOTO *et al.*, 1995), vereinbar mit der Theorie der „Field cancerization“.

In Frage gestellt werden muß allerdings die Aussagekraft eines mittels eines extrem sensitiven Verfahrens erhaltenen, für eine Mutation positiven Ergebnisses aus Gewebe, in dem bei mikroskopischer Durchsicht keine tumorverdächtigen Zellen entdeckt werden können.

Schon der der zu untersuchenden Schleimhaut aufliegende Zelldetritus könnte somit zur Erhöhung der Mutationsfrequenz beitragen. Bekanntermaßen stellen gerade diese sensitiven Untersuchungsverfahren eine effektive Möglichkeit dar, in Faeces (SIDRANSKI, 1992) oder

Lavageflüssigkeit (TOBI *et al.*, 1994, SMITH-RAVIN *et al.*, 1995) kleinste Mengen mutierter *k-ras*-Allele nachzuweisen.

Auch die Entnahmetechnik der Gewebeproben sollte bei der Interpretation von positiven Ergebnissen Berücksichtigung finden. So könnte z.B. bei der Asservierung der Normalgewebeprobe die Benutzung desselben Messers wie für die Entnahme der Tumorprobe schon zur Verschleppung von mutiertem *k-ras* führen und zum positiven Ausfall der Untersuchung führen.

Die Interpretation von *k-ras*-Mutationen in an die Tumoren angrenzender mikroskopisch normaler Schleimhaut als „*field cancerisation*“ läßt an eine endogene oder exogene Schädigung der gesamten Kolonschleimhaut z.B. durch die Exposition mit einem nutritiven Karzinogen oder durch eine Keimbahnmutation denken. „Field cancerization“ würde sich damit nicht auf ein lokales Umfeld in der direkten Tumorumgebung, sondern auf die gesamte Kolonschleimhaut beziehen. Folglich müßten bei gezielter Aufarbeitung der restlichen Kolonschleimhaut solcher Patienten multipelste Läsionen mit molekularen Aberrationen in histologisch normaler Schleimhaut zu finden sein. Die Frage, ob Patienten, die Mutationen in angrenzendem Normalgewebe besitzen, adäquat onkologisch therapiert sind, könnte in diesem Zusammenhang formuliert werden. Das Vorkommen von metachronen Tumoren ist mit etwa 3,5-5% (CHU *et al.*, 1986, TOGASHI *et al.*, 2000) allerdings seltener als die in einigen Studien mit bis zu 60% (und damit fast höher als in den Tumoren selbst) angegebene Mutationsfrequenz von *k-ras* in unauffälliger Mucosa.

Um die klinische Relevanz von Mutationen eines *k-ras*-Allels in histologisch unauffälliger Kolonschleimhaut aus der Tumorumgebung zu erörtern, wäre ein follow-up solcher Patienten im Rahmen weiterführender Studien interessant, mit besonderem Augenmerk auf das Auftreten metachroner kolorektaler Neoplasien.

Auch wäre eine Überprüfung der Befunde im Rahmen der Tumornachsorge durch Stufenbiopsien der betroffenen Patienten leicht möglich und zu fordern. Vorteilhaft wäre hierbei vor allem die Möglichkeit,

Normalgewebeproben nach der Entfernung des Primärtumors ohne die Möglichkeit einer Materialverschleppung entnehmen zu können.

#### **IV.1.6 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Wie oben erwähnt, entsteht das Gros der Karzinome über die Adenom-Karzinom-Sequenz. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hingegen wird auch das Auftreten über eine Dysplasie-Karzinom-Sequenz unter Umgehung des Adenom-Stadiums postuliert (MORSON *et al.*, 1967; YARDLEY *et al.*, 1974). Diese Tumoren erscheinen meist schon bei jüngeren Patienten mit einem durchschnittlichen Lebensalter von 40 – 42 Jahren (DEVROEDE *et al.*, 1971). Sie kommen oft multizentrisch vor und sind ausgeglichener auf das Kolorektum verteilt als bei sporadischen kolorektalen Karzinomen, obwohl bei der Colitis ulcerosa Karzinome im linken Kolon durchschnittlich zehn Jahre später als im Transversum und rechten Kolon auftreten ( GREENSTEIN *et al.*, 1979). Ein hoher Prozentsatz der Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinome geht einher mit schlecht differenzierten oder fortgeschrittenen Tumoren aufgrund der schwierigen Diagnostik (RIDDELL *et al.*, 1983). Screening für Hochrisikopatienten beschränkt sich hauptsächlich auf regelmäßige Koloskopien mit der Gewinnung multipler Biopsien, obwohl diese Methode sehr subjektiv und in ihrer Rechtfertigung fraglich erscheint (GYDE, 1990).

In Anbetracht des in der Literatur beschriebenen Vorkommens mutierter *ras*-Allele in histologisch normaler Mukosa von Patienten mit sporadischen CRC stellten wir uns die Frage, ob in chronisch entzündlich veränderten Arealen Alterationen im molekularbiologischen Status von *k-ras* auftreten und so prognostische Hinweise auf eine mögliche Entartung bei länger bestehenden entzündlichen Darmerkrankungen bieten könnten.

Es wurden von 7 Patienten mit Morbus Crohn (Erkrankungsdauer 8 bis 9 Jahre) 12 Proben und von 5 Patienten mit Colitis ulcerosa (Erkrankungsdauer 3 bis 37 Jahre) 12 Proben, davon ein Polyp und ein Karzinom, untersucht. Alle Patienten wurden aufgrund von krankheitstypischen Komplikationen einem chirurgischen Eingriff unterzogen. Es waren dies im einzelnen: entzündliche Konglomerattumoren, akute

intestinale Blutung, Stenosen, Fistelsysteme, therapieresistente Pankolitis mit z.T. vorhandenen Dysplasien sowie oben beschriebene Neoplasie.

Keine der untersuchten Proben, weder die entzündlich veränderten Gewebe noch die neoplastischen Läsionen, wiesen Veränderungen im *k-ras*-Gen auf.

In Gewebeproben von Patienten mit Colitis ulcerosa konnten auf eine genetische Instabilität hinweisende Veränderungen der Ploidität in Regionen nachgewiesen werden, die keine erkennbaren Dysplasien enthielten, ebenso in räumlich weit voneinander entfernt gelegenen Mucosaarealen (LEVINE *et al.*, 1988, CUVELIER *et al.*, 1987, RABINOVITCH *et al.*, 1989).

Obwohl *ras*-Mutationen als sehr frühe Ereignisse in der Tumorigenese angesehen werden, konnten somit in chronisch entzündlich verändertem Gewebe bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen keine Mutationen gefunden werden. Diese Befunde decken sich mit den Angaben von BURMER *et al.* (1990), der in fünf an Karzinome auf dem Boden einer Colitis ulcerosa angrenzenden Mucosaarealen keine *k-ras*-Mutationen nachweisen konnte.

In der Literatur wird ein signifikant häufigeres Auftreten von Mutationen bei sporadischen Karzinomen als bei Colitis-ulcerosa-assoziierten Malignomen beschrieben (BURMER *et al.*, 1990; BELL *et al.*, 1991), wie auch eine unterschiedliche Lokalisationsverteilung von *k-ras*-Mutationen, die bei sporadischen Tumoren eher im Rektum als im Kolon gefunden wurden, bei Colitis ulcerosa dagegen umgekehrt (BELL *et al.*, 1991).

Fraglich ist die Genese von Adenomen, die bei Colitis ulcerosa nachgewiesen werden. Hier ist offensichtlich die Tumorprogression nicht über die sog. Dysplasie-Karzinom-Sequenz erfolgt. WALSH *et al.* (1999) konnten genetische Unterschiede zwischen Colitis ulcerosa-assoziierten polypoiden dysplastischen Läsionen und sporadischen Adenomen bei Colitis ulcerosa aufzeigen. Dagegen konnten sie keinen unterschiedlichen

molekularen Genotyp zwischen sporadischen Adenomen bei Patienten mit und ohne Colitis ulcerosa finden.

Somit scheinen Adenome bei Colitis ulcerosa eine Sonderstellung einzunehmen; K-*ras*-positive Adenome und Karzinome bei Colitis ulcerosa könnten also auch von der Grunderkrankung unabhängige, über den sporadischen Weg aufgetretene Neoplasien darstellen.

Diese Befunde legen die Existenz anderer genetischer Mechanismen der Tumorprogression bei Colitis ulcerosa nahe.

In neueren Veröffentlichungen werden z.T. schon vor dem Nachweis von Dysplasien auftretende Chromosomeninstabilitäten (RABINOVITCH *et al.*, 1999) und Mikrosatellitenmutationen (HEINEN *et al.*, 1997) beschrieben. Weiterhin scheint die Mutation von p53 ein relativ frühes Ereignis in der Entwicklung Colitis ulcerosa-assoziiierter Karzinome zu sein (SHAPIRO *et al.*, 1997; HOLZMANN *et al.*, 1998) und läßt sich schon in dysplastischer wie auch histologisch normal aussehender Mucosa nachweisen (KIM *et al.*, 1998).

Ein Screening von Patienten mit langjähriger Colitis ulcerosa auf Veränderungen des k-*ras*-Status zur Früherkennung prä-maligner oder maligner Läsionen ist somit nicht sinnvoll. Weitere Studien zur Erforschung der Faktoren, die zur Malignomentstehung bei Colitis ulcerosa führen, sind notwendig. Mit Hilfe neuer Marker könnten demnächst molekulare Verfahren zur Verfügung stehen, die die Therapieplanung ausgeprägter Krankheitsbilder bei Colitis ulcerosa entscheidend beeinflussen könnten.

#### IV.1.7 Familiäre Adenomatöse Polyposis

Die familiäre adenomatöse Polyposis ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung. Im Vordergrund stehen hierbei konstitutionelle Mutationen im APC-Gen, das auf dem langen Arm von Chromosom 5 gelegen ist. Es fungiert als ein Tumorsuppressorgen.

Die Funktion des APC-Genproduktes steht in enger Verbindung zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ - Cateninen. Diese Proteine binden an das Zelloberflächenmolekül E-Cadherin und spielen eine Rolle bei der Zelladhäsion (CUNNINGHAM *et al.*, 1994). Es wird vermutet, daß das APC-Protein somit einen Einfluß auf die Interaktionen zwischen den Cateninen und E-Cadherin hat und dadurch in die Zelladhäsion und möglicherweise in interzelluläre Kommunikation eingreift (RUBINFELD *et al.*, SU *et al.*, beide 1993).

Auch bei sporadischen kolorektalen Adenomen und Karzinomen werden häufig somatische Mutationen des APC-Gens beobachtet. Seine Inaktivierung scheint eine der frühesten Ereignisse in der Tumorigenese der sporadischen kolorektalen Karzinome zu sein (POWELL *et al.*, 1992).

Dagegen treten auch bei der Entstehung kolorektaler Karzinome auf dem Boden einer FAP weitere molekulare Veränderungen auf. K-ras-Mutationen sind, wie auch von mir gezeigt werden konnte, häufige Ereignisse in der Tumorigenese. Die in Adenomen gefundenen Mutationen mit 32% nur unwesentlich seltener als bei sporadischen Adenomen (37,5%); in karzinomatösen Läsionen bei FAP wurde nicht eine Mutation nachgewiesen, was in Zusammenhang mit der geringen Fallzahl gesehen werden muß.

Vogelstein *et al.* (1988) sehen den Tumorprogress nach Initiation der Tumorigenese durch die bekannte Mutation am FAP-Locus für Tumoren bei Polyposis coli gleich wie bei den sporadischen kolorektalen Karzinomen.

Ein alternativer Weg der Tumorigenese unter Umgehung des vorbeschriebenen Tumorprogressionsmodells könnte somit durch andere verantwortliche, für Zelladhäsionsmoleküle kodierende Gene erfolgen.

## **IV.2 E-Cadherin**

### **IV.2.1 Diskussion der Methode**

Mit Hilfe der SSCP können nicht bekannte Mutationen eines zu untersuchenden Gens detektiert werden. Dies steht im direkten Kontrast zur Durchführung einer RFLP, die dann durchgeführt werden kann, wenn eine definierte, umschriebene Region innerhalb eines Gens mit gehäuftem Auftreten von Punktmutationen bekannt ist. Da nach dem Stand der Literatur Mutationen des CDH1 insgesamt seltene Ereignisse ohne Akkumulation im Bereich eines bestimmten Codons sind und zum Untersuchungszeitpunkt keine Studien an kolorektalen Karzinomen veröffentlicht waren, war die SSCP für die Untersuchung des E-Cadherin-Gens die Methodik der Wahl.

Wie oben beschrieben, stellt sich eine Mutation durch eine Änderung der Sekundärstruktur und ein hierdurch bedingtes anderes Laufverhalten im Gel im Vergleich zum Wildtypallel dar. Die Conformation einzelsträngiger DNA ist erheblich bestimmt durch das Gleichgewicht zwischen thermaler Fluktuation und schwachen lokalen Stabilisierungsfaktoren wie kurze Basenpaarungen innerhalb des Einzelstranges (ORITA *et al.*, 1989). Somit sind eine Vielzahl verschiedener Faktoren verantwortlich für die Komposition der letztlich im Gel dargestellten Strukturen.

Abweichungen in Umgebungsbedingungen scheinen eine Änderung in der Conformation zu bedingen, was mittels der SSCP-Analyse als eine Veränderung der Mobilität erkannt werden kann. Hierzu zählen die Länge der DNA-Fragmente, die Temperatur während der Elektrophorese, das Ausmaß des Cross-Linkings, die Konzentration des Acrylamids, die ionische Stärke, Denaturantien, Glycerolkonzentration und Pufferkonzentration (SPINARDI *et al.*, 1991, MICHAUD *et al.*, 1992, LEREN *et al.*, 1993). ORITA *et al.* (1989)

demonstrierten dies anhand von Veränderungen in der Temperatur und der Anwesenheit von Glycerol. Trotzdem konnten sie unter allen Bedingungen einen Mobilitätsshift verzeichnen; die Mutationen wurden also jedesmal sichtbar. Auch das Muster der Separationen war jedesmal reproduzierbar, wenn die Bedingungen genau eingehalten wurden.

Als wichtigster Parameter wird die Temperaturvariation eingeschätzt. Um falsch negative Befunde zu vermeiden, führten wir deshalb unsere Untersuchungen unter zwei verschiedenen Temperaturbedingungen (4°C und Raumtemperatur) durch.

#### **IV.2.2 Diskussion der Ergebnisse**

Die Metastasierung maligner Tumoren ist eine Folge verminderter Zell-Zell-Adhäsion und damit bewirkter Steigerung der Invasivität in benachbartes Gewebe. Als ein molekulares Substrat dieses Mechanismus kristallisierten sich die Cadherine heraus.

Sie scheinen die stärksten Adhäsionsmoleküle zu sein; die Inaktivierung anderer Adhäsionssysteme hat wenig Effekt auf die Zell-Zelladhäsion (DUBAND *et al.*, 1987; LARJAVA *et al.*, 1990). E-Cadherin c-DNA-Transfektion in invasive Karzinomzellen verdeutlicht seine starke Invasions-Suppressionsfunktion, zumindest *in vitro* (FRIXEN *et al.*, 1991; VLEMINCKX *et al.*, 1991), mit einer durch die Aktivierung von E-Cadherin bedingten Wachstumsretardierung von Tumorzellen (NAVARRO *et al.*, 1991; WATABE *et al.*, 1994). Somit sind sie in die Gruppe der Tumorsuppressor-Moleküle einzustufen (TSUKITA *et al.*, 1993).

Histomorphologische Untersuchungen verdeutlichen anschaulich das Resultat verminderter oder fehlender Cadherinwirkung. In Experimenten mit Zelllinien, deren E-Cadherinfunktion durch Anti-E-Cadherin blockiert wurde, zeigte sich eine Veränderung ihrer Morphologie von einem epithelialen zu einem fibroblastoiden Typ und eine Veränderung zu einem diffuseren Wachstumsmuster (BEHRENS *et al.*, 1985; GUMBINER *et al.*, 1986), mit

Erlangung invasiven Potentials. Bei mikroskopischer Betrachtung der von uns untersuchten Tumorzellen der Zelllinie KATO III zeigte sich ein abgekugelt, nicht flächig wachsendes Erscheinungsbild, passend zur bei ihr bekannten Mutation von CDH1.

Darüber hinaus demonstrierten Mischversuche mit unterschiedlichen Zelltypen, daß sich z.B. untereinander gemischte Leber- und Nierenzellen aufgrund unterschiedlicher qualitativer oder quantitativer Cadherin-Expression nach kurzer Zeit wieder in organspezifischen Zellverbänden zusammenfinden (TAKEICHI *et al.*, 1981, NOSE *et al.*, 1988, FRIEDLANDER *et al.*, 1989). Dieser Mechanismus besteht bei Krebszellen nicht; sie können sich unter fast jeden Zelltyp mischen als Ausdruck ihrer Invasivität.

Sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede in der Expression von Cadherinen scheinen somit eine wichtige Funktion in der Ausbildung von Gewebsverbänden zu bilden.

Die Verminderung der Expression von E-Cadherin bei kolorektalen Karzinomen wurde von mehreren Autoren beschrieben (NIGAM *et al.*, 1993, DORUDI *et al.*, 1993, 1995, SOLIC *et al.*, 1995, VAN AKEN *et al.*, 1993). Allerdings wird berichtet, daß die Zell-Zell-Adhäsion in diffus wachsenden Karzinomen gelegentlich trotz einer ausreichenden Menge an E-Cadherin verloren geht (ODA *et al.*, 1994). Trotz dieser Berichte über eine verringerte Expression gab es zum Untersuchungszeitpunkt nur eine Veröffentlichung über Allelverluste am CDH1-Locus (ILYAS *et al.*, 1997), und Mutationen bei kolorektalen Karzinomen waren meines Wissens nicht untersucht.

Irreversible E-Cadherin-inaktivierende Mutationen wurden für Karzinome gastralen Ursprungs (BECKER *et al.*, 1993, 1994, ODA *et al.*, 1994), für Endometrium- und Ovarialkarzinome (RISINGER *et al.*, 1994) sowie für lobuläre Mammakarzinome (BERX *et al.*, 1995, 1996) beschrieben.

E-Cadherin-Gen-Mutationen wurden in 50% bei Magenkarzinomen vom diffusen Typ gefunden, aber nicht bei Karzinomen vom intestinalen Typ (BECKER *et al.*, 1993, 1994). Obwohl diese Ergebnisse hinweisend für eine niedrige Mutationsfrequenz bei im Zellverband wachsenden Karzinomen (wie dem kolorektalen Karzinom) sind, interessierte uns das Mutationsverhalten bei kolorektalen Karzinomen, zumal auch in der Literatur eine abschließende Beurteilung bezüglich der Mutationsraten verschiedener epithelialer Tumoren als verfrüht angesehen wurde (BERX *et al.*, 1997).

Die in der Literatur zum Untersuchungszeitpunkt veröffentlichten Mutationen bei epithelialen Tumoren anderen Ursprungs erstreckten sich über 9 von 16 Exons; es zeigte sich hierbei die Tendenz einer Akkumulation in den Exons 6-10, die für die extrazellulären Domänen von E-Cadherin codieren (BERX *et al.*, 1995). Wir entschieden uns daher, unsere Untersuchungen auf diesen Bereich zu beschränken und übernahmen die von BERX *et al.* 1995 beschriebene Methodik in leicht modifizierter Form.

Unser Untersuchungsgut bestand aus Gewebeproben von Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren; Voraussetzung war zumindest ein N1-Stadium. Wie oben beschrieben, konnten keine Mutationen in den untersuchten Exons nachgewiesen werden.

Mittlerweile sind einzelne Mutationen des CDH1 bei kolorektalen Karzinomen beschrieben. Diese beschränkten sich auf Deletionen einzelner Basen in Exon 3 in vier von 49 untersuchten replikationsfehlerpositiven (RER+) Zelllinien von drei Patienten mit kolorektalen Karzinomen (Codons 120 und 126), die einen vorzeitigen Abbruch an Codon 216 bewirkten (EFSTATHIOU *et al.*, 1999) sowie verschiedene Keimbahnmutationen (KIM *et al.*, 2000, RICHARDS, 1999). Insgesamt scheinen sie aber keine typischen Mutationen in der Tumorigenese kolorektaler Neoplasien darzustellen.

DNA-mismatch-repair-Defekte führen zu Replikationsfehlern. Diese sind in nahezu allen Karzinomen von Patienten mit HNPCC nachweisbar, bei Patienten mit sporadischen kolorektalen Karzinomen dagegen nur in 10 bis 20%. Auffällig ist das mit 30% erhöht beschriebene Vorkommen von E-Cadherin-Mutationen bei RER+ Tumoren im Vergleich zu nur 7% bei replikationsnegativen Tumoren. Von mir wurden jedoch ausschließlich Patienten mit anamnestisch sporadischen kolorektalen Neoplasien untersucht.

Die Reduktion der E-Cadherin-Catenin-vermittelten Zelladhäsion ist mit der Zellmigration sowie der frühen Reparationsphase bei der Epithelrestitution ulzerativer Veränderungen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert (HANBY *et al.* 1996). In frühen neoplastischen Veränderungen bei Colitis ulcerosa treten gelegentlich ebenfalls Mutationen auf, die für eine extrazelluläre Domäne codieren (JANKOWSKI *et al.*, 1998).

Es bestehen somit weitere Hinweise für alternative Wege in der Tumorigenese kolorektaler Karzinome unterschiedlicher Ätiologie wie der Colitis ulcerosa. Auch Karzinome mit von der normalen Wuchsform kolorektaler Karzinome abweichender Histologie wie Siegelringkarzinome oder muzinöse Karzinome sollten eingehender auf Mutationen oder verringerte Expression von E-Cadherin untersucht werden. Mein Untersuchungsspektrum beschränkte sich leider nur auf eine Probe eines Siegelringkarzinoms.

Mutationen des CDH1 sind offensichtlich eher seltene Ereignisse. Eine Fülle anderer Mechanismen können dagegen zu einer verminderten Adhäsivität beitragen. Die Zell-Adhäsion ist nicht alleine abhängig von der Struktur und der funktionellen Integrität des E-Cadherinmoleküls selbst, sondern auch von den assoziierten Cateninen und weiteren für die Bindung an das Zytoskelett relevanten Molekülen. Beeinträchtigt werden kann sie auch durch eine Reduktion oder den Verlust der E-Cadherin-Expression, Verteilung des E-Cadherins an verschiedene Orte innerhalb der Zelle oder eine kompetitive Hemmung der Bindungsstellen durch andere Proteine (JIANG, 1996).

DAMSKY *et al.* (1983) sowie KATAYAMA *et al.* (1994, a u. b) konnten E-Cadherin-Fragmente mit einer Masse von ca. 80 kDa im Medium einer Mammakarzinomzelllinie sowie in Serum und Urin der Karzinompatienten nachweisen. Diese Fragmente können möglicherweise zusätzlich mit normalen E-Cadherinmolekülen interferieren und so zu einer gesteigerten Invasivität in gesundes Gewebe beitragen.

Wie oben beschrieben, spielt der Cadherin-Catenin-Komplex nicht nur in der statischen Epithelstabilisierung, sondern in einer ganzen Reihe physiologischer Abläufe wie z. B. im Rahmen der embryonalen Entwicklung oder auch bei der Wundheilung eine zentrale Rolle. Hierfür ist ein dezidierter Regulationsmechanismus essentiell. Damit ein Epitheldefekt geschlossen werden kann, muß es zu einer intermittierenden Reduktion der Zelladhäsion wie auch einer Stimulation der Zellmotilität kommen. Um diesem Anspruch zu genügen, stehen mehrere Übertragungswege zur Verfügung, die durch unterschiedlichste externe Faktoren aktiviert werden können. Veränderungen in der Zelladhäsion können somit durch ein Ungleichgewicht, auch durch Mutationen jeder dieser Komponenten zustande kommen. Zu erwähnen wären hier erneut Mutationen im APC-Gen, das über die Catenine eine Funktion in der Zell-Adhäsion besitzt.

Wichtige Faktoren sind z.B. der Epidermal growth Factor (EGF) oder der Transforming Growth Factor (TGF- $\alpha$ ), die durch Stimulation des EGFR eine Downregulation der E-Cadherin-Expression bewirken. Mögliche Mechanismen einer erhöhten EGF- oder TGF- $\alpha$ -Konzentration können bei Malignomen durch Sekretion aus der Tumorumgebung aufgrund von Hypoxie oder Nekrose sowie durch autokrine Sekretion der Tumorzellen selbst bedingt oder aber auch als physiologischer Mechanismus im Rahmen der Wundheilung zu sehen sein. In diesen Kontext passt auch die Beobachtung, daß E-Cadherin in Epithelzellen, die an Ulcerationen im Gastrointestinaltrakt angrenzen, vermindert exprimiert ist (DOGAN *et al.*, 1995).

Neben verschiedensten intra- und extrazellulären Ursachen hat sich außerdem gezeigt, daß eine Hypoxie innerhalb von Tumoren, die eine Tumornekrose zur Folge hat, eine Downregulation von E-Cadherin bewirkt und somit die Metastasierung anstoßen kann (BEAVON, 1999). Hierbei sollen aus der Nekrosezone aktive Substanzen wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und zytotoxische Faktoren wie Stickstoffmonoxyd freigesetzt werden, die die Zell-Adhäsion vermindern, DNA-Mutationen fördern und die Angiogenese stimulieren. In diesem Zusammenhang wird eine Zunahme der Tumoraggressivität nach palliativer Bestrahlung mit hierdurch bedingten vaskulären Veränderungen diskutiert (RAMSAY *et al.*, 1998, NATHANSON *et al.*, 1989).

Mit den bislang bekannten molekularbiologischen Veränderungen liegen einzelne Teile eines großen Puzzles vor, in dem sowohl Veränderungen von *k-ras* wie auch des Cadherin-Catenin-Komplexes über noch längst nicht vollständig bekannte Mechanismen zusammenwirken. Irgendwann könnten uns die Techniken der Nukleinsäurenchemie erlauben, alle Unterschiede in Nukleotidsequenzen und Genexpressionen darzulegen, die eine Krebszelle von ihrem normalen Gegenstück unterscheidet, und vielleicht werden zu diesem Zeitpunkt die einzelnen Schritte, die in der Karzinogenese involviert sind, nicht mehr in Zweifel gestellt werden (CAIRNS, 1981). Bis dahin führt ein weiter Weg, der noch eine Reihe Fragen offen läßt und zu weiteren Untersuchungen anregt.

## V. Zusammenfassung

Diese Arbeit weist zwei verschiedene Schwerpunkte auf. Mit Hilfe einer 2-Step-RFLP wurden Gewebeprobe- n von Patienten mit kolorektalen Erkrankungen auf Punktmutationen der ersten beiden Basen von Codon 12 des *k-ras* Gens untersucht. Zum anderen wurde eine SSCP zum Nachweis von Mutationen des E-Cadherin-Gens bei kolorektalen Karzinomen verwendet.

Mikroskopisch unauffällige Schleimhaut aus der Nachbarschaft kolorektaler Karzinome und entzündlich veränderte Gewebeprobe- n von Patienten mit lange bestehenden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden neben neoplastischen Läsionen sporadischen Ursprungs, bei Colitis ulcerosa und Polyposis coli auf das Ausmaß von *k-ras*-Mutationen untersucht.

In einigen Veröffentlichungen wurden mittels sehr sensitiver Untersuchungsverfahren *k-ras* Mutationen in mikroskopisch normaler Schleimhaut aus der Umgebung maligner Tumoren beschrieben. Diese wurden als Mikrometastasierung oder „field cancerization“ gedeutet. Es konnte an einer im Vergleich zur Literatur relativ umfangreichen Stichprobe gezeigt werden, daß Mutationen in an die Tumoren angrenzendem Normalgewebe zwar vorkommen, aber eher seltene Ereignisse darstellen.

Bei Patienten mit länger bestehenden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen besteht ein erhöhtes Risiko für das Auftreten kolorektaler Karzinome. Die Malignomentstehung über eine Dysplasie-Karzinom-Sequenz erschwert ein Screening. In den untersuchten entzündlichen Gewebeprobe- n konnten allerdings in keiner der untersuchten Proben Mutationen von *k-ras* nachgewiesen werden. Auch die jeweils untersuchte Adenom- und Karzinomprobe wiesen Wildtyp-DNA für *k-ras* auf. Die in der Literatur beschriebenen insgesamt niedrigeren Mutationsraten weisen auf alternative Tumorentstehungswege hin. Die Untersuchung auf *k-ras* Mutationen stellt somit keine geeignete Screeningmethode für diese Patienten dar.

Neoplasien sporadischer und familiärer Genese zeigen etwa gleiche *k-ras*-Mutationsfrequenzen. Bei sporadischen Tumoren läßt sich eine abnehmende Mutationshäufigkeit mit zunehmendem Tumorprogress erkennen. Als Ursachen werden der Verlust des die *k-ras*-Mutation beinhaltenden Zellklons im Laufe des Tumorprogresses oder eine *de novo* Karzinomentstehung unter Umgehung des Adenomstadiums diskutiert. Signifikante Korrelationen zwischen dem Auftreten von Mutationen und dem Alter, Geschlecht oder Tumorstadium bestehen nicht. Kolonkarzinome weisen mit 50% eine deutlich, jedoch nicht signifikant höhere Mutationsrate als Rektumkarzinome (24%) auf.

Mutationen in den Exons 6 bis 10 von E-Cadherin wurden in keinem der 14 untersuchten sporadischen kolorektalen Karzinomen gefunden. Die mittlerweile beschriebenen vereinzelt Mutationen des *CDH1* bei kolorektalen Karzinomen beschränkten sich auf Deletionen einzelner Basen in Exon 3 replikations-fehlerpositiver Zelllinien sowie verschiedene Keimbahnmutationen. Insgesamt scheinen sie aber keine typischen Mutationen in der Tumorigenese kolorektaler Neoplasien darzustellen.

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

AIVADO, M., GYNES, M., GORELOV, V., SCHMIDT, W.U., RÖHER, H.-D., GORETZKI, P.E.: "Field cancerisation"- ein zusätzliches Phänomen in der Entwicklung von Kolontumoren? Der Chirurg, 71: 1230-1235, 2000

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D.: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York London, Third Edition, p966, 1994

ALMOGUERA, C., SHIBATA, D., FORRESTER, K., MARTIN, J., ARNHEIM, M., PERUCHO, M.: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell, 53: 549-554, 1988

ARENAS, R.B., FICHERA, A., MHOON, D., MICHELASSI, F.: Incidence and therapeutic implications of synchronous colonic pathology in colorectal adenocarcinoma. Surgery, 122(4): 706-709, disc. 709-710, 1997

BASERGA, R.: Oncogenes and the strategy of growth factors. Cell, 79: 927-930, 1994

BAUER, K.H.: Mutationstheorie der Geschwulst-Entstehung. Übergang von Körperzellen in Geschwulstzellen durch Gen-Änderung. Springer, Berlin, 1928

BEART, R.W., MELTON, L.J., MARUTA, M., DOCKERTY, M.B., FRYDENBERG, H.B., O'FALLON, W.M.: Trends in right and left-sided colon cancer. Dis. Colon Rectum, 26(6): 393-398, 1983

BEAVON, I.R.G.: Regulation of E-Cadherin: does hypoxia initiate the metastatic cascade? J. Clin. Pathol: Mol. Pathol., 52: 179-188, 1999

BECKER, K.F., ATKINSON, M.J., REICH, U., HUANG, H.H., NEKARDA, H., SIEWERT, J.R., HOFER, H.: Exon skipping in the E-Cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Hum. Mol. Genet.*, 2(6): 803-804, 1993

BECKER, K.F., ATKINSON, M.J., REICH, U., BECKER, I., NEKARDA, H., SIEWERT, J.R., HOFER, H.: E-Cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res.*, 54(14): 3845-52, 1994

BEHRENS, J., BIRCHMEIER, W., GOODMAN, S.L., IMHOF, B.A.: Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related uvomorulin. *J. Cell. Biol.*, 101(4): 1307-1315, 1985

Bell, S.M., Kelly, S.A., Hoyle, J.A., Lewis, F.A., Taylor, G.R., Thompson, H., Dixon, M.F., Quirke, P.: C-KI-RAS GENE MUTATIONS IN DYSPLASIA AND CARCINOMAS COMPLICATING ULCERATIVE COLITIS. *BR. J. CANCER*, 64: 174-178, 1991

BELL, S.M., SCOTT, N., CROSS, D., SAGAR, P., LEWIS, F., BLAIR, G.E., TAYLOR, G., DIXON, M., QUIRKE, P.: Prognostic value of p53 overexpression and c-kirras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 104: 57-64, 1993

Benhattar, J., Losi, L., Chaubert, P., Givel, J.C., Costa, J.: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF K-RAS MUTATIONS IN COLORECTAL CARCINOMA. *GASTROENTEROLOGY*, 104(4): 1044-8, 1993

BERNSTEIN, L.R., LIOTTA, L.A.: Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr. Opin. Oncol.*, 6: 106-113, 1994

BERX, G., CLETON-JANSEN, A.M., NOLLET, F., DE LEEUW, W.J., VAN DE VIJVER, M., CORNELISSE, C., VAN ROY, F. : E-cadherin is a tumor/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J.*, 14(24): 6107-6115, 1995

BERX, G., CLETON-JANSEN, A.M., STRUMANE, K., DE LEEUW, W.J., NOLLET, F., VAN ROY, F., CORNELISSE, C. : E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*, 13(9): 1919-1925, 1996

BERX, G., NOLLET, F., STRUMANE, K., ROY VAN, F.: An Efficient and Reliable Multiplex PCR-SSCP Mutation Analysis Test Applied to the Human E-Cadherin Gene. *Human Mutation*, 9: 567-574, 1997

BIRCHMEIER, W., BEHERENS, J.: Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta*, 1198: 11-26, 1994

BISHOP, J.M.: Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 301-354, 1983

BISHOP, J.M.: Viral oncogenes. *Cell*, 42: 23-38, 1985

BISHOP, J.M.: The Molecular Genetics of Cancer. *Science*, 235: 305-311, 1987

BISHOP, J.M.: Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64(2): 235-48, 1991

BODMER, W.F., BAILEY, C.J., BODMER, J., BUSSEY, H.J.R., ELLIS, A., GORMAN, P., LUCIBELLO, F.C., MURDAY, V.A., RIDER, S.H., SCAMBLER, P., SHEER, D., SOLOMON, E., SPURR, N.K.: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, 328: 614-616, 1987

BOLLER, K., VESTWEBER, D., KEMLER, R.: Cell-adhesion molecule uvomorulin is located in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 100, 327-332, 1985

BOS, J.L., TOKSOZ, D., MARSHALL, C.J., VERLAAN- DE VRIES, M., VEENEMANN, G.H., VAN DER EB, A., VAN BOOM, J.H., JANSSEN, J.W., STEENVOORDEN, A.C.: Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia. *Nature*, 315: 726-730, 1985

BOS, J.L., FEARON, E.R., HAMILTON, S.R., VERLAAN- DE VRIES, M., BOOM, J.H., VAN DER EB, A.J., VOGELSTEIN, B.: Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 327: 293-297, 1987

BOS, J.L.: Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res.*, 49: 4682-4689, 1989

BOS, J., VRIES, M.V., JANSEN, A.M., VEENEEMANN, G.H., VAN BOOM, J.H., VAN DER EB, A.J.: Three different mutations in codon 61 of the human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotide hybridization. *Nucleic Acids Res.*, 12: 9155-9163, 1984

BOYLE, P.: Global burden of cancer. *Lancet*, 349 (Suppl. II): 23-26. 1997

BREIVIC, J., MELING, G.I., SPURKLAND, A., ROGNUM, T.O., GAUDERNACK, G.: K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br. J. Cancer*, 69: 367-371, 1994

BUBB, V.J., CURTIS, L.J., CUNNINGHAM, C.: Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene*, 12:2641-2649,1996

BURKITT, D. P.: Related disease-related cause? *Lancet*, 2: 1229-1231, 1962

BURMER, G.C., LOEB, L.A.: Mutations in the *KRAS2* oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2403-2407, 1989

BURMER, G.C., LEVINE, D.S., KULANDER, B.G., HAGGITT, R.C., RUBIN, C.E., RABINOVITCH, P.S.: C-Ki-ras Mutations in Chronic Ulcerative Colitis and Sporadic Colon Carcinoma. *Gastroenterology*, 99: 416-420, 1990

Burmer, G.C., Rabinovitch, P.S., Loeb, L.A.: Frequency and spectrum of c-Ki-ras mutations in human sporadic colon carcinoma, carcinomas arising in ulcerative colitis, and pancreatic adenocarcinoma. *Environ. Health Perspect.* 93: 27-31, 1991

BURT, R., GARFIED, S., JOHNSON, K., THORGEIRSSON, S.: Transformation of rat liver epithelial cells with v-H-ras or v-raf causes expression of MDR-1, glutathione-S-transferase-P and increased resistance to cytotoxic chemicals. *Carcinogenesis*, 9: 2329-2332, 1988

BUSSEMAKERS, M.J., VAN BOKHOVEN, A., MEES, S.G., Kemler, R., Schalken, J.A.: Molecular cloning and characterization of the human E-cadherin cDNA. *Mol. Biol. Rep.*, 17(2): 123-128, 1993

CAIRNS, J.: The origin of human cancers. *Nature*, 289: 353-357, 1981

CAPELLA, G., CRONAUER-MITRA, S., PEINADO, M. A., PERUCHO, M.: Frequency and Spectrum of Mutations at Codons 12 and 13 of the c-K-ras Gene in Human Tumors. *Env. Health Persp.*, 93: 125-131, 1991

CAPON, D.J., SEEBURG, P.H., MCGRATH, J.P., HAYFLICK, J.S., EDMAN, U., LEVINSON, D., GOEDDEL, D.V.: Activation of Ki-ras 2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature*, 304: 507-512, 1983

CHEN, J., VIOLA, M.V.: A Method to Detect ras Point Mutations in Small Subpopulations of Cells. *Analytical Biochemistry*, 195: 51-56, 1991

CHIN, K.-V., UEDA, K., PASTAN, I., GOTTESMAN, M.: Modulation of activity of the promoter of the human Mdr1 gene by ras and p53. *Science*, 255: 459-462, 1992

CHU, D.Z., GIACCO, G., MARTIN, R.G., GIUNEE, V.F.: The significance of synchronous carcinoma and polyps in the colon and rectum. *Cancer*, 57(3): 445-450, 1986

CUNNINGHAM, C., DUNLOP, M.G.: Genetics of colorectal cancer. Brit. Medical Bulletin, 50: 640-655; 1994

CUVELIER, C.A., MORSON, B.C., ROELS, H.J.: The DNA content in cancer and dysplasia in chronic ulcerative colitis. Histopathology, 11: 927-939, 1987

DAMSKY, C.H., RICHA, J., SOLTER, D., KNUDSON, K., BUCK, C.A.: Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. Cell, 34: 455-466, 1983

DAWSON, T.P., RADULESCU, A., WYNFORD-THOMAS, D.: Expression of Mutant p21<sup>ras</sup> Induces Insulin-like Growth Factor 1 Secretion in Thyroid Epithelial Cells. Cancer Research, 55: 915-920, 1995

DER, C.J., KRONTIRIS, T.G., COOPER, G.M.: Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 3637-3640, 1982

DEVROEDE, G.J., TAYLOR, W.F., SAUER, W.G., JACKMAN, R.J., STICKLER, G.B.: Cancer risk and life expectancy of children with ulcerative colitis. N. Engl. J. Med., 285: 17-21, 1971

DOGAN, A., WANG, Z.D., SPENCER, J.: E-Cadherin-expression in intestinal epithelium. J. Clin. Pathol. 48: 143-146, 1995

DONALIES, M., CRAMER, M., RINGWALD, M.: Expression of M-Cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(18): 8024-8028, 1991

DORUDI, S., SHEFFIELD, J.P., POULSOM, R., NORTHOVER, J.M., HART, I.R.: E-Cadherin in colorectal cancer. An immunohistochemical and in situ hybridisation study. Am. J. Pathol., 142: 981-986, 1993

DORUDI, S., HANBY, A.M., POULSOM, R., NORTHOVER, J., HART, I.R.: Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome. *British J. of Cancer*, 71: 614-616, 1995

DUBAND, J.L., DUFOUR, S., HATTA, K., TAKEICHI, M., EDELMAN, G.M., THIERY, J.P.: Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *J. Cell. Biol.*, 104(5): 1361-1374, 1987

EFSTATHIOU, J.A., LIU, D., WHEELER, J.M., KIM, H.C., BECK, N.E., ILYAS, M., KARAYANNAKIS, A.J., MORTENSEN, N.J., KMIOT, W., PLAYFORD, R.J., PIGNATELLE, M., BODMER, W.F.: Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(5): 2316-2321, 1999

ELLIS, R.W., Defeo, D., Shih, T.Y., GONDA, M.A., YOUNG, H.A., TSUCHIDA, N., LOWY, D.R., SCOLNICK, E.M.: The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature*, 292 (5823), 506-511, 1981

ELLIS, V., PIKE, C., ERIKSON, J., SOLBERG, H., DANØ, K.: The urokinase receptor: involvement in cell surface proteolysis and cancer invasion. *Ann. NY Acad. Sci.*, 667: 13-31, 1992

FARBER, E., CAMERON, R.: The sequential analysis of cancer development. *Adv. Cancer Res.*, 31: 125-226, 1980

FEARON, E.R., VOGELSTEIN, B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5): 759-767, 1990

FEIG, L. A.: The Many Roads That Lead to Ras. *Science*, 260: 767-768, 1993

FINKELSTEIN, S. D., SAYEGH, R., BAKKER, A., SWALSKY, P.: Determination of Tumor aggressiveness in Colorectal Cancer by K-ras-2 Analysis. *Arch. Surg.*, 128: 526-532, 1993

FOLKMAN, J.: Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* 43:175-203, 1985

FOLKMAN, J.: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.*, 1: 27-31, 1995

FORRESTER, K., ALMOGUERA, C., HAN, K., GRIZZLE, W.E., PERUCHO, M.: Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature*, 28: 298-303, 1987

FOULDS, L.: The natural history of cancer. *J. Chronic Dis.*, 8: 2-37, 1958

FRIELANDER, D.R., MEGE, R.M., CUNNINGHAM, B.A., EDELMAN, G.M.: Cell sorting-out is modulated by both the specificity and amount of different cell adhesion molecules (CAMs) expressed on cell surface. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86(18): 7043-7047, 1989

FRIXEN, U.H., BEHRENS, J., SACHS, M., EBERLE, G., VOSS, B., WARDA, A., LOCHNER, D., BIRCHMEIER, W.: E-Cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell. Biol.*, 113(1): 173-185, 1991

GALLIN, W.J., SORKIN, B.C., EDELMAN, G.M., CUNNINGHAM, B.A.: Sequence analysis of a cDNA clone encoding the liver cell adhesion molecule, L-CAM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2808-2812, 1987

GAY, N.J., WALKER, J.E.: Homology between human bladder carcinoma oncogene product and mitochondrial ATP-synthase. *Nature*, 301: 262-264, 1983

GREENSTEIN, A.J., SACHAR, D.B., PUCILLO, A.: Cancer in universal and left-sided ulcerative colitis: clinical and pathological features. *M. J. Sinai J. Med.*, 45, 25-32, 1979

GRODEN, J., THLIVERIS, A., SAMOWITZ, W., CARLSON, M., GELBERT, L.,

ALBERTSEN, H., STEVENS, J., SPIRO, L., ROBERTSON, M., *et al.*: Identification and characterisation of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66: 589-600, 1991

GUMBINER, B., SIMONS, K.: A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J. Cell. Biol.*, 102(2): 457-468, 1986

GUMBINER, B., STEVENSON, B., GRIMALDI, A.: The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J. Cell. Biol.*, 107: 1575-1587, 1988

GYDE, S.: Screening for colorectal cancer in ulcerative colitis: dubious benefits and high costs. *Gut*, 31(10): 1089 -1092, 1990

HAENSZEL, W. : Cancer mortality among the foreign born in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.*, 26: 37-132, 1961

HAGAG, N., HALEGOUA, S., VIOLA, M.: Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. *Nature*, 319:680-682, 1986

HANBY, A.M., CHINERY, R., POULSOM, R., PLAYFORD, R.J., PIGNATELLI, M.: Downregulation of E-Cadherin in the reparative epithelium of the human gastrointestinal tract. *Am. J. Pathol.*, 148: 723-729, 1996

HATTA, K., NOSE, A., NAGAFUCHI, A., TAKEICHI, M.: Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J. Cell Biol.*, 106: 873-881, 1988

HECKER, E., FUSENIG, N.E., KUNZ, W., MARKS, F., THIELMANN, H.W. (eds.): *Carcinogenesis-a Comprehensive Survey*. Raven Press Vol.7, 1982

HEINEN, C.D., NOFFSINGER, A.E., BELLI, J., STRAUGHEN, J., FISCHER, J., GRODEN, J., FENOGLIO-PREISER, C.M.: Regenerative lesions in ulcerative

colitis are characterized by microsatellite mutation. *Genes Chromosome Cancer*, 19(3): 170-175, 1997

HERMANEK, P., FRÜHMORGEN, P., GUGGENMOOS-HOLZMANN, I., ALTENDORF, A., MATEK, W.: The malignant Potential of Colorectal Polyps – A New Statistical Approach. *Endoscopy*, 15: 16-20, 1983

HERRENKNECHT, K., OZAWA, M., ECKERSKORN, C., LOTTSPEICH, F., LENTER, M.: The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9156-9160, 1991

HILL, M.J., ARIES, V.C.: Faecal steroid composition and its relationship to cancer of the large bowel. *J. Pathology*, 104: 129-139, 1971

HILL, M.J., MORSON, B.C., BUSSEY, H.J.R.: Aetiology of adenoma-carcinoma sequence in large bowel. *Lancet*, I: 245-247, 1978

HIRANO, S., NOSE, A., HATTA, K., KAWAKAMI, A., TAKEICHI, M.: Calcium-dependent cell-cell-adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J. Cell Biol.*, 105: 2501-2510, 1987

HOLZMANN, K., KLUMP, B., BORCHARD, F., HSIEH, C.J., KÜHN, A., GACO, V., GREGOR, M., PORSCHEN, R.: Comparative analysis of histology, DNA content, p53 and ki-ras mutations in colectomy specimens with long-standing ulcerative colitis. *Int. J. Cancer*, 76(1): 1-6, 1998

HUNT, N.C.A., DOUGLAS-JONES, A.G., JASANI, B., MORGAN, J.M., PIGNATELLI, M.: Loss of E-Cadherin expression associated with lymph node metastases in small breast carcinomas. *Virchows Arch.*, 430: 285-289, 1997

ILYAS, M., TOMLINSON, I.P., HANBY, A., TALBOT, I.C., BODMER, W.F.: Allele loss, replication errors and loss of expression of E-cadherin in colorectal cancers. *Gut*, 40(5): 654-659, 1997

INUZUKA, H., REDIES, C., TAKEICHI, M.: Differential expression of R- and N-Cadherin in neural and mesodermal tissues during early chicken development. *Development*, 113(3): 959-967, 1991

JANKOWSKI, J.A., BEDFORD, F.K., BOULTON, R.A., CRUICKSHANK, N., ELDER, J., ALLAN, R., FORBES, A., KIM, Y.S., WRIGHT, N.A., SAMDERS, D.S.: Alterations in classical cadherins associated with progression in ulcerative and Crohn's colitis. *Lab. Invest.*, 78: 1155-1167, 1998

JIANG, W., KAHN, S.M., GUILLEM, J.G., LU, S.H., WEINSTEIN, I.B.: Rapid detection of ras oncogenes in human tumours: applications to colon, esophageal and gastric cancer. *Oncogene*, 4: 923-928, 1989

JIANG, W.G.: E-Cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br. J. Surg.*, 83 : 437-446, 1996

JULIANO, R.L., VARNER, J.A.: Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5: 812-818, 1993

KANAI, Y., ODA, T., TSUDA, H., Ochiai, H., Hirohashi, S.: Point Mutation of the E-Cadherin Gene in Invasive Lobular Carcinoma of the Breast. *JPN. J. Cancer Res.*, 85: 1035-1039, 1994

KARNER-HANUSCH, J., WOLF, B.: Molekularbiologische und genetische Konzepte des kolorektalen Karzinoms. In: Zielinski, C., Jakesz, R.: *Onkologie heute, Colorektales Carcinom*. Springer-Verlag Wien, p14, 1999

KATAYAMA, M., HIRAI, S., KAMIHAGI, K., NAKAGAWA, K., YASUMOTO, M., KATO, I.: Soluble E-Cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br. J. Cancer*, 69:580-585, 1994 a

KATAYAMA, M., HIRAI, S., YASUMOTO, M., NISHIKAWA, K., NAGATA, S., OTSUKA, M., KAMIHAGI, K., KATO, I.: Soluble fragments of E-Cadherin cell adhesion molecule increase in urinary excretion of cancer patients, potentially

indicating its shedding from epithelial tumor cells. *Int J. oncol.*, 5: 1049-1057, 1994 b

KERN, S.E., FEARON, E., TERSMETTE, K., ENTERLINE, J., LEPPERT, M., NAKAMURA, Y., WHITE, R., VOGELSTEIN, B., HAMILTON, S.: Allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA*, 261: 3099-3103, 1991

KIM, H.J., CHANG, S.K.: p53 mutation in patients with ulcerative colitis in rectal biopsy. *Korean J. Intern Med.*, 13(2): 110-116, 1998

KIM, H.C., WHEELER, J.M., KIM, J.C., ILYAS, M., BECK, N.E., KIM, B.S., PARK, K.C., BODMER, W.F.: The E-Cadherin gene (CDH1) variants T340A and L599V in gastric and colorectal cancer patients in korea. *Gut*, 47(2): 262-267, 2000

KOPNIN, B.: Genetic events responsible for colorectal tumorigenesis: achievements and challenges. *Tumori.*, 79(4): 235-243, 1993

KNUDSEN, K.A., WHELOCK, M.J.: Plakoglobin, or an 83-kD homologue distinct from beta-catenin, interacts with E-Cadherin and N-Cadherin. *J. Cell. Biol.*, 118: 671-679, 1992

KUMAR, R., SUKUMAR, S., BARBACID, M.: Activation of *ras* Oncogenes Preceding the Onset of Neoplasia. *Science*, 248: 1101-1104, 1990

LAND, H., PARADA, L.F., WEINBERG, R.A.: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, 304: 596-602, 1983

LANE, M.A., SAINTEN, A., COOPER, G.M.: Activation of related transforming genes in mouse and human mammary carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(8): 5185-5189, 1981

LARVAJA, H., PELTONEN, J., AKIYAMA, S.K., YAMADA, S.S., GRALNICK, H.R., UITTO, J., YAMADA, K.M.: Novel function for beta 1 integrins in keratinocyte cell-cell interactions. *J. Cell. Biol.*, 110(3): 803-815, 1990

LAURENT-PUIG, P., OLSCHWANG, S., DELATTRE, O., REMVIKOS, Y., ASSELAIN, B., MELOT, T., VALDIRE, P., MULERIS, M., GIRODET, J., SALMON, R., THOMAS, G.: Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 102: 1136-1141, 1992

LEREN, T.P., SOLBERG, K., RODNINGEN, O.K., Ose, L., Tonstad, S., Berg, K.: Evaluation of running conditions for SSCP analysis: application of SSCP for detection of point mutations in the LDL receptor gene. *PCR Methods Appl.*, 3(3): 159-162, 1993

LEVI, S., URBANO-ISPIZUA, A., GILL, R., THOMAS, D.M., GILBERTSON, J., FOSTER, C., MARSHALL, C.J.: Multiple K-ras codon 12 Mutations in Cholangiocarcinomas Demonstrated with a Sensitive Polymerase Chain Reaction Technique. *Cancer research*, 3497-3502, 1991.

LEVINE, D.S., REID, B.J., HAGGITT, R.C., RUBIN, C.E., REID, B.J.: Frequency and distribution of aneuploid cell populations in chronic ulcerative colitis (abstr.). *Gastroenterology*, 94: 260, 1988

LEWIN, B.: *Gene*. VCH-Verlagsgesellschaft, 1991

LI, Y., BOLLAG, G., CLARK, R., STEVEN, J., CONROY, L., FULTS, D., WARD, K., FRIEDMAN, E., SAMOWITZ, W., ROBERTSON, M., BRADLEY, P., MCCORMICK, F., WHITE, R., CAWTHON, R.: Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors. *Cell*, 69:275-281, 1992

LIOTTA, L.A., STEEG, P.S., STETLER-STEVENSON, W.G.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 64: 327-336, 1991

LIOTTA, L.A.: Cancer cell invasion and metastasis. *Sci. Am.*, 266: 34-41, 1992

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J.E.: Molecular cell biology. Freeman and Company, New York, 1999

LOSI, L., BENHATTER, J., COSTA, J.: Stability of K-ras Mutations Throughout the Natural History of Human Colorectal Cancer. *Eur. J. Cancer*, 28A: 1115-1120, 1992

MACDONALD, N.J., STEEG, P.S.: Molecular basis of tumour metastasis. *Cancer Surv.* 16: 175-199, 1993

MAREEL, M., BRACKE, M., VAN ROY, F.: Invasion promoter versus invasion suppressor molecules: the paradigm of E-Cadherin. *Mol. Biol. Rep.*, 19: 45-67, 1994

MARKOWITZ, S., HINES, J.D., LUTTERBAUGH, J., MYEROFF, L., RUSTUM, Y., LUNA, E., KLEINERMANN, J.: Mutant k-ras Oncogenes in Colon Cancers Do Not Predict Patient's Chemotherapy Response or Survival. *Clin. Cancer Res.*, (1): 441-445, 1995

MARIYAMA, M., KISHI, K., NAKAMURA, K., Obata, H., Nishimura, S.: Frequency and types of point mutation at the 12<sup>th</sup> codon of the c-K-ras gene found in pancreatic cancers from Japanese patients. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80: 622-626, 1989

MATRISIAN, L.M.: The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, 14: 455-463, 1992

MCCORMICK, F.: Ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell*, 56(1): 5-8, 1989

MCCORMICK, F.: Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4(1): 71-76, 1994

MCCREA, P.D., GUMBINER, B.M.: Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-Cadherin (uvomorulin). Characterisation and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J. Biol. Chem.*, 266: 4514-4520, 1991

MCGRATH, J.P., CAPON, D.J., SMITH, D.H., CHEN, E.Y., SEEBURG, P.H., GOEDEL, D.V., LEVINSON, A.D.: Structure and organization of the human *Ki-ras* proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature*, 304: 501-506, 1983

MCGRATH, J.P., CAPON, D.J., GOEDEL, D.V., LEVINSON, A.D.: Comparative biochemical properties of normal and activated human *ras* p21 protein. *Nature (London)*, 310: 644-649, 1984

MELTZER, S.J., MANE, S.M., WOOD, P.K., RESAU, J.H., NEWKIRK, C., TERZAKIS, J.A., KORELITZ, B.I., WEINSTEIN, W.M., NEEDLEMAN, S.W.: Activation of c-K-ras in human gastrointestinal dysplasias determined by direct sequencing of polymerase chain products. *Cancer Res.*, 50: 3627-3630, 1990

MICHAUD, J., BRODY, L.C., STEEL, G., FONTAINE, G., MARTIN, L.S., VALLE, D., MITCHELL, G.: Strand-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine delta-aminotransferase gene. *Genomics*, 13(2): 389-394, 1992

MINAMOTO, T., YAMASHITA, N., OCHIAI, A., MAI, M., SUGIMURA, T., RONAI, Z., ESUMI, H.: Mutant *K-ras* in Apparently Normal Mucosa of Colorectal Cancer Patients. *Cancer*, 75: 1520-1526, 1995

MOERKERK, P., ARENDS, J.W., VAN DRIEL, M., DE BRUINE, A., DE GOEIJ, A., TEN KATE, J.: Type and number of *Ki-ras* Point Mutations Relate to Stage of Human Colorectal Cancer. *Cancer Res.*, 54: 3376-3378, 1994

MORRIN, M., KELLY, M., BARRETT, N., DELANEY, P.: Mutations of *Ki-ras* and *p53* genes in colorectal cancer and their prognostic significance. *Gut*, 35: 1627-1631, 1994

MORSON, B.C., PANG, L.S.C.: Rectal biopsy as an aid to cancer control in ulcerative colitis. *Gut*, 8, 423-434, 1967

MORSON, B.: Polyps and Cancer of the Large Bowel. *West. J. Med.*, 125: 93-99, 1976

MÜLLER, R., SLAMON, D.J., TREMBLAY, M., CLINE, M.J., VERMA, I.M.: Differential expression of cellular oncogenes during pre-and postnatal development of the mouse. *Nature*, 299 (5884), 640-644, 1982

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Sym. Quant. Biol.* 51Pt 1: 263-273, 1986

MURRAY, M.J., SHILO, B.Z., SHIH, C., COWING, D., HSU, H.W., WEINBERG, R.A.: Three different human tumor cell lines contain different oncogenes. *Cell*, 25(2): 355-361, 1981

NAGAFUCHI, A., SHIRAYOSHI, Y., OKAZAKI, K., YASUDA, K., TAKEICHI, M.: Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-Cadherin DNA. *Nature*, 329: 341-343, 1987

NATHANSON, S.D., WESTRICK, P., ANAYA, P., Hetzel, F.W., Jacobsen, G.: Relationship of spontaneous regional lymph node metastases to dose of local irradiation of primary B16 melanomas. *Cancer Res.*, 49: 4412-4416, 1989

NAVARRO, P., GOMEZ, M., PIZARRO, A., GAMALLO, C., QUINTANILLA, M., CANO, A.: A role for the E-Cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell. Biol.*, 115(2): 517-533, 1991

NEWTON, C.R., GRAHAM, A.: PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 1994

NICOLSON, G.L.: Molecular mechanisms of cancer metastasis: tumour and host properties and the role of oncogenes and suppressor genes. *Curr. Opin. Oncol.*, 3: 75-92, 1991

NIGAM, A.K., SAVAGE, F.J., BOULOS, P.B., STAMP, G.W.H., LIU, D., PIGNATELLI, M.: Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Brit. J. Cancer*, 68: 507-514, 1993

NOSE, A., NAGAFUCHI, A., TAKEICHI, M.: Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *EMBO J.*, 6: 3655-3661, 1987

NOSE, A., NAGAFUCHI, A., TAKEICHI, M.: Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell*, 54(7): 993-1001, 1988

NOWELL, P.: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23-28, 1976

ODA, T., KANAI, Y., OYAMA, T., YOSHIURA, K., SHIMOYAMA, Y., BIRCHMEIER, W.: E-Cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 1858-1862, 1994

ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T., HAYASHI, K.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5(4): 874-879, 1989

PARADA, L.F., TABIN, C.J., SHIH, C., WEINBERG, R.A.: Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*, 297: 474-478, 1982

PELTOMÄKI, P., LOTHE, R.A., AALTONEN, L.A., PYLKKANEN, L., NYSTROM-LAHTI, M., SERUCA, R., DAVID, L., HOLM, R., RYBERG, D., HAUGEN, A., *et al.*: Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the

hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.*, 53, 5853-5855, 1993

PERUCHO, M., GOLDFARB, M., SHIMIZU, K., LAMA, C., FOGH, J., WIGLER, M.: Human tumor-derived cell-lines contain common and different transforming genes. *Cell*, 27: 467-476, 1981

PERUCHO, M., FORRESTER, K., ALMOGUERA, C., KAHN, S., LAMA, C., SHIBATA, D., ARNHEIM, N., GRIZZLE, W.E.: Expression and mutational activation of the *c-Ki-ras* gene in human carcinomas. In: *Cancer Cells*, Vol. 7 (M. Furth and Greaves, Eds.), Cold Spring Harbor, NY, 137-141, 1989

PIMENTEL, E.: *Oncogenes*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989

POWELL, S.M., ZILZ, N., BEAZER-BARCLAY, Y., BRYAN, T.M., HAMILTON, S.R., THIBODEAU, S.N., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W.: *APC* mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359: 235-237, 1992

PULCIANI, S., SANTOS, E., LAUVER, A.V., LONG, L.K., AARONSON, S.A., BARBACID, M.: Oncogenes in solid human tumours. *Nature*, 300 (5892): 539-542, 1982

RABINOVITCH, P.S., BURMER, G.C., HAGGITT, R.C., LEVINE, D.S., RUBIN, C.E., REID, B.J.: Flow cytometric changes that precede cancer: premalignant gastrointestinal disease. In: *New Technologies in Cytometry*. Proc. Int. Soc. Optical Engineering, 1063 :170-177, 1989

RABINOVITCH, P.S., DZIADON, S., BRETNALL, T.A., EMOND, M.J., CRISPIN, D.A., HAGGITT, R.C., BRONNER, M.P.: Pancolonic chromosomal instability precedes dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Cancer Res.*, 59(20): 5148-5153, 1999

RAMSAY, J., SUIT, H.D., SEDLACEK, R. : Experimental studies on the incidence of metastases after failure of radiation treatment and the effect of salvage surgery. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 14: 1165-1168, 1998

REDDY, B.S., ENGEL, A., SIMI, B., GOLDMAN, M.: Effect of dietary fibre on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology*, 102: 1475-1482, 1992

RICHARDS, F.M., MCKEE, S.A., RAJPAR, M.H., COLE, T.R., EVANS, D.G., JANKOWSKI, J.A., MCKEOWN, C., SANDERS, D.S., MAHER, E.R.: Germline E-Cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum. Mol. Genet.*, 8(4): 607-610, 1999

RIDDELL, R.H., GOLDMAN, H., RANSOHOFF, D.F., APPELMAN, H.D., FENOGLIO, C.M., HAGGIT, R.C., AHREN, C., CORREA, P., HAMILTON, S.R., MORSON, B.C., *et al.*: Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Human Pathol.*, 14, 931-968, 1983

RINGWALD, M., SCHUH, R., VESTWEBER, D., EISTETTER, H., LOTTSPEICH, F., ENGEL, J., DOLZ, R., JAHNIG, F., EPPLEN, J., MAYER, S., *et al.*: The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent cell adhesion. *EMBO J.*, 6: 3647-3653, 1987

RISINGER, J.I., BERCHUK, A., KOHLER, M.F., BOYD, J.: Mutations of the E-Cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat. Genet.*, 7(1): 98-102, 1994

ROCHLITZ, C.F., HEIDE, I., DE KANT, E., BÖHMER, R., PETER, F.J., NEUHAUS, P., HUHN, D., HERRMANN, R.: Position Specificity of Ki-ras Oncogene Mutations during the Progression of Colorectal Carcinoma. *Oncology*, 50: 70-76, 1993

RONAI, Z., LAU, Y., COHEN, L., : Dietary N-3 fatty acids do not affect induction of H-ras mutations in mammary glands of NMU-treated rats. *Mol. Carcinogenesis*, 4: 120-128, 1991

RONAI, Z.: *Ras* Oncogene Detection in Pre-neoplastic Lesions: Possible Applications for Diagnosis and Prevention. *Oncology Research*, 4: 45-48, 1992

RONAI, Z., LUO, F.C., GRADIA, S., HART, W.J., BUTLER, R.: Detection of K-ras mutation in normal and malignant colonic tissues by an enriched PCR method. *Int. J. Oncol.*, 4: 391-396, 1994

RUBINFELD, B., SOUZA, B., ALBERT, I., MULLER, O., CHAMBERLAIN, S.H., MASIARZ, F.R., MUNEMITSU, S., POLAKIS, P.: Association of the APC gene product with  $\beta$ -Catenin. *Science*, 262: 1731-1734, 1993

SAIKI, R. K., GELFLAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A.: Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1987

SANTOS, E., TRONICK, S.R., AARONSON, S.A., PULCHIANI, S., BARBACID, M.: T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature*, 298: 343-347, 1982

SCOLNICK, E.M., PAPAGEORGE, A.G., SHIH, T.Y.: Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(10), 1979

SENBA, S., KONISHI, F., OKAMOTO, T., KASHIWAGI, H., KANAZAWA, K., MIYAKI, M., KONISHI, M., TSUKAMOTO, T.: Clinicopathologic and Genetic Features of Nonfamilial Colorectal Carcinomas with DNA Replication Errors. *Cancer*, 82(2): 279-285, 1998

SHAPIRO, B.D., LASHNER, B.A.: Cancer biology in ulcerative colitis and potential use in endoscopic surveillance. *Gastrointes. Endosc. Clin. N. Am.*, 7(3): 453-468, 1997

SHIBATA, D., SCHAEFFER, J., LI, Z.-H., CAPELLA, G., PERUCHO, M.: Genetic Heterogeneity of The c-K-ras Locus in Colorectal Adenomas but not in Adenocarcinomas. *J. of the Nat. Cancer Inst.*, 85: 1058-1068, 1993

SHIH, T.Y., WEEKS, M.O., GRUSS, P., DHAR, R., OROSZLAN, S., SCOLNICK, E.M.: Identification of a precursor in the biosynthesis of the p21 transforming protein of harvey murine sarcoma virus. *J. Virol.*, 42(1): 253-261, 1982

SHIMIZU, K., GOLDFARB, M., SUARD, Y., PERUCHO, M., LI, Y., KAMATA, T., FERAMISO, J., STAVNEZER, E., FOGH, J., WIGLER, M.H.: Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2112-2116, 1983

SHINO, Y., WATANABE, A., YAMADA, Y., TANASE, M., YAMADA, T., MATSUDA, M., YAMASHITA, J., TATSUMI, M., MIWA, T., NAKANO, H.: Clinicopathologic evaluation of immunohistochemical E-Cadherin expression in human gastric carcinomas. *Cancer*, 76: 2193-2201, 1995

SIDRANSKI, D., TOKINO, T., HAMILTON, S.R., KINZLER, K.W., LEVIN, B., FROST, P., VOGELSTEIN, B.: Identification of ras Oncogene Mutations in the Stool of Patients with curable Colorectal Tumors. *Science*, 256: 102-104, 1992

SKLAR, M.: Increased resistance to cis-diaminedichloroplatinium (II) in NIH 3T3 cells transformed by ras oncogenes. *Cancer Res.*, 48: 793-797, 1988a

SKLAR, M.: The ras oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. *Science*, 239: 645-647, 1988b

SLATER, G.I., HABER, R.H., AUFSES, A.H.Jr.: Changing distribution of carcinoma of the colon and rectum. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 158(3): 216-218, 1984

SLEBOS, R., KIBBELAAR, R., DALESIO, O., KOOISTRA, A., STAM, J., MEIJER, C. WAGINAAR, S., VANDERSCHUEREN, R., ZANDWIJK, N., MOOI, W., BOS, J., RODENHUIS, S.: K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N. Engl. J. Med.*, 323: 561-5665, 1990

SMIT, V.T.H.B.M., BOOT, A.J.M., SMITS, A.M.M., FLEUREN, G.J., CORNELISSE, C.J., BOS, J.L.: K-ras codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res.*, 16: 7773-7782, 1988

SMITH-RAVIN, J., ENGLAND, J., TALBOT, I. C., BODMER, W.: Detection of c-Ki-ras mutations in faecal samples from sporadic colorectal cancer patients. *Gut*, 36: 81-86, 1995

SOLIC, N., COLLINS, J.E., RICHTER, A., HOLT, S.J., CAMPBELL, I., ALEXANDER, P., DAVIES, D.E.: Two Newly Established Cell Lines Derived From the Same Colonic Adenocarcinoma exhibit Differences in EGF-Receptor Ligand and Adhesion Molecule Expression. *Intg. J. Cancer*, 62: 48-57, 1995

SPINARDI, L., MAZARS, R., THEILLET, C.: Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res.*, 19(14): 4009, 1991

STOKER, M., GHERARDI, E.: Regulation of cell movement: the motogenic cytokines. *Biochem. Biophys. Acta*, 1072: 81-102, 1991

SU, L.K., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W.: Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*, 262: 1734-1737. 1993

TAKAMURA, S., SHIOZAKI, H., MIYATA, M., Kadowaki, T., Inoue, M., Matsui, S., Iwazawa, T., Takayama, T., Takeichi, M., Monden, M.: Decreased E-Cadherin expression is associated with haematogenous recurrence and poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br. J. Surg.*, 83: 1608-1614, 1996

TAKEICHI, M., ATSUMI, T., YOSHIDA, C., UNO, K., OKADA, T.S.: Selective adhesion of embryonal carcinoma cells and differentiated cells by Ca<sup>2+</sup>-dependent sites. *Dev. Biol.*, 87(2): 340-350, 1981

TAKEICHI, M.: The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102(4): 639-655, 1988

TAKEICHI, M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251(5000): 1451-1455, 1991

TAKEICHI, M.: Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 5: 806-811, 1993

TOBI, M.; LUO, F.-C.; RONAI, Z.: Detection of K-ras Mutation in Colonic Effluent Samples From Patients Without Evidence of Colorectal Carcinoma. *J. of Nat-Canc-Inst.*, 86:1007-1010,1994

TOGASHI, K., KONISHI, F., OZAWA, A., SATO, T., SHITO, K. KASHIWAGI, H., OKADA, M., NAGAI, H.: Predictive factors for detecting colorectal carcinomas in surveillance colonoscopy after colorectal cancer surgery. *Dis. Colon Rectum*, 43(10): 47-53, 2000

TRAHEY, M., MCCORMICK, F.: A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*, 238 (4826), 542-545, 1987

TSUKITA, S., ITOH, M., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S.: Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. *J. Cell. Biol.*, 123(5): 1049-1053, 1993

VAN AKEN, J., CUVELIER, C.A., DE WEVER, N., ROELS, J., GAO, Y., MAREEL, M.: Immunohistochemical analysis of E-Cadherin expression in human colorectal tumours. *Pathol. Res. Pract.*, 189. 975-978, 1993

VAN ROY, F., MAREEL, M.: Tumour invasion: effects of cell adhesion and motility. *Trends Cell. Biol.*, 2: 163-169, 1992

VARMUS, H. E.: The Molecular Genetics of Cellular Oncogenes. *Ann. Rev. Genet.*, 18: 553-612, 1984

VLEMINCKX, K., VAKAET, L., MAREEL, M., FIERS, W., VAN ROY, F.: Genetic manipulation of E-Cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 66(1): 107-109, 1991

VOGELSTEIN, B., FEARON, E.R., HAMILTON, S.R., KERN, S.E., PREISINGER, A.C., LEPPERT, M., NAKAMURA, Y., WHITE, R., SMITS, A.M., BOS, J.L.: Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England J.Med.*, 319: 525-532, 1988

WALSH, S.V., LODA, M., TORRES, C.M., ANTONIOLI, D., ODZE, R.D.: P53 and beta catenin expression in chronic ulcerative colitis-associated polypoid dysplasia and sporadic adenomas: an immunohistochemical study. *Am. J. Surg. Pathol.*, 23(8): 963-969, 1999

WATABE, M., NAGAFUCHI, A., TSUKITA, S., TAKEICHI, M.: Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma cell line. *J. Cell. Biol.*, 127(1): 247-256, 1994

WEINBERG, R.A.: The action of oncogenes in the cytoplasm and the nucleus. *Science*, 230: 770-776, 1985

WEINBERG, A.: Oncogenes, Antioncogenes, and the Molecular Bases of Multistep Carcinogenesis. *Cancer Research*, 49: 3713-3721, 1989

WILLINGHAM, M.C., PASTAN, I., SHIH, T.Y., SCOLNICK, E.M.: Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell*, 19(4): 1005-1014, 1980

WINTER, E., YAMAMOTO, F., ALMOGUERA, C., PERUCHO, M.: A method to detect and characterise point mutations in transcribed genes: amplification and overexpresion of the mutant c-ki-ras allele in human tumour cells., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 82:7575-7579, 1985

YAMAGATA, S., MUTO, T., UCHIDA, Y., MASAKI, T., SAWADA, T., TSUNO, N., HIROOKA, T.: Lower Incidence of K-ras Codon 12 Mutation in Flat Colorectal Adenomas than in Polypoid Adenomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 85:147-151, 1994

YAMAGATA, S., MUTO, T., UCHIDA, Y., MASAKI, T., HIGUCHI, Y., SAWADA, T., HIROOKA, T.: Polypoid Growth and K-ras Codon 12 Mutation in Colorectal Cancer. *Cancer*, 75: 953-957, 1995

YARDLEY, J.H., KEREN, D.F.: Precancer lesions in ulcerative colitis. *Cancer*, 34, 835-844, 1974

ZHU, D., KEOHAVONG, P., FINKELSTEIN, S.: K-ras gene mutations in normal colorectal tissues from k-ras mutation-positive colorectal cancer patients. *Cancer Res.*, 57 : 2485-2492, 1997

### **Danksagung:**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H.D. Röher herzlich für die Vergabe des Themas, die Übernahme des Referates sowie das Interesse an meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. W.U. Schmidt für die Anleitung bei der Durchführung der Versuche, sowie dafür, mein Interesse an der Chirurgie geweckt zu haben.

Allen Mitarbeitern des Institutes, vor allem Frau B. Ebeling, Dr. V. Gorelov und Dr. V. Stoldt, danke ich für die vielfältigen Ratschläge, die ständige Hilfsbereitschaft sowie das nette Arbeitsklima.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meinem Mann danken, die mir während meines gesamten Studiums und der Entstehungsphase dieser Arbeit liebevoll zur Seite standen.

## **Lebenslauf:**

Am 27. Juli 1973 wurde ich als Tochter des Diplom-Ingenieurs Helge Luckenbach und seiner Ehefrau Heike, geb. Müller, in Krefeld geboren.

1979 wurde ich in die Antonius-Grundschule in Neukirchen-Vluyn eingeschult und besuchte ab 1983 das Julius-Stursberg-Gymnasium ebenfalls in Neukirchen-Vluyn. 1992 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Zum Wintersemester 1992 erhielt ich einen Studienplatz für Medizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Im Herbst 1994 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, im Herbst 1995 den ersten Teil, im Frühjahr 1998 den zweiten Teil und im Mai 1999 den dritten Teil der ärztlichen Prüfung.

Im Dezember 1995 begann ich meine Tätigkeit als Doktorandin im Gen-Labor S1 der Chirurgischen Klinik A der Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf.

Von Juli 1999 bis Dezember 2000 absolvierte ich meine Zeit als Ärztin im Praktikum in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie am Klinikum Krefeld. Seit meiner Approbation im Januar 2001 bin ich dort als Assistenzärztin tätig.

Seit dem 7. Juli 2000 bin ich mit Hans-Werner Siebeneicher verheiratet.

## Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

*K-ras* und E-Cadherin-Mutationen bei kolorektalen Neoplasien, angrenzendem Normalgewebe und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

in der Chirurgischen Klinik A der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Röher mit Unterstützung durch Herrn Dr. Schmidt ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit zur Dissertation vorgelegt.

Krefeld, den 23. Oktober 2002

Susanne Siebeneicher

### Abstract

Diese Arbeit weist zwei verschiedene Schwerpunkte auf. Mit Hilfe einer 2-Step-RFLP wurden Gewebeproben von Patienten mit kolorektalen Erkrankungen auf Punktmutationen der ersten beiden Basen von Codon 12 des *k-ras* Gens untersucht. Zum anderen wurde eine SSCP zum Nachweis von Mutationen des E-Cadherin-Gens bei kolorektalen Karzinomen verwendet.

Mikroskopisch unauffällige Schleimhaut aus der Nachbarschaft kolorektaler Karzinome und entzündlich veränderte Gewebeproben von Patienten mit lange bestehenden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden neben neoplastischen Läsionen sporadischen Ursprungs, bei Colitis ulcerosa und Polyposis coli auf das Ausmaß von *k-ras*-Mutationen untersucht.

In einigen Veröffentlichungen wurden mittels sehr sensitiver Untersuchungsverfahren *k-ras* Mutationen in mikroskopisch normaler Schleimhaut aus der Umgebung maligner Tumoren beschrieben. Diese wurden als Mikrometastasierung oder „field cancerization“ gedeutet. Es konnte an einer im Vergleich zur Literatur relativ umfangreichen Stichprobe gezeigt werden, daß Mutationen in an die Tumoren angrenzendem Normalgewebe zwar vorkommen, aber eher seltene Ereignisse darstellen.

Bei Patienten mit länger bestehenden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen besteht ein erhöhtes Risiko für das Auftreten kolorektaler Karzinome. Die Malignomentstehung über eine Dysplasie-Karzinom-Sequenz erschwert ein Screening. In den untersuchten entzündlichen Gewebeproben konnten allerdings in keiner der untersuchten Proben Mutationen von *k-ras* nachgewiesen werden. Auch die jeweils untersuchte Adenom- und Karzinomprobe wiesen Wildtyp-DNA für *k-ras* auf. Die in der Literatur beschriebenen insgesamt niedrigeren Mutationsraten weisen auf alternative Tumorentstehungswege hin. Die Untersuchung auf *k-ras* Mutationen stellt somit keine geeignete Screeningmethode für diese Patienten dar.

Neoplasien sporadischer und familiärer Genese zeigen etwa gleiche *k-ras*-Mutationsfrequenzen. Bei sporadischen Tumoren läßt sich eine abnehmende Mutationshäufigkeit mit zunehmendem Tumorprogress erkennen. Als Ursachen werden der Verlust des die *k-ras*-Mutation beinhaltenden Zellklons im Laufe des Tumorprogresses oder eine *de novo* Karzinomentstehung unter Umgehung des Adenomstadiums diskutiert. Signifikante Korrelationen zwischen dem Auftreten von Mutationen und dem Alter, Geschlecht oder Tumorstadium bestehen nicht. Kolonkarzinome weisen mit 50% eine deutlich, jedoch nicht signifikant höhere Mutationsrate als Rektumkarzinome (24%) auf.

Mutationen in den Exons 6 bis 10 von E-Cadherin wurden in keinem der 14 untersuchten sporadischen kolorektalen Karzinomen gefunden. Die mittlerweile beschriebenen vereinzelt Mutationen des CDH1 bei kolorektalen Karzinomen beschränkten sich auf Deletionen einzelner Basen in Exon 3 replikations-fehlerpositiver Zelllinien sowie verschiedene Keimbahnmutationen. Insgesamt scheinen sie aber keine typischen Mutationen in der Tumorigenese kolorektaler Neoplasien darzustellen.