

Aus der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und
Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
[Campus Charité Mitte]

DISSERTATION

**Mikrosatellitenanalysen an zellfreier DNA bei Patienten
mit Colitis ulcerosa**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Peter Rauh

aus Schleiz

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. habil. St. Rickes
2.: Prof. Dr. med. P. Malfertheiner
3.: Priv.-Doz. Dr. med. M. Pirlich

Datum der Promotion: 27.03.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1. Colitis ulcerosa und das erhöhte Karzinomrisiko.....	5
1.2. DNA und Mikrosatelliten.....	6
1.2.1. Isolation zellfreier DNA aus dem Serum.....	6
1.2.2. Isolation von DNA aus Gewebeproben.....	6
1.2.3. Isolation von DNA aus Stuhlproben.....	6
1.3. Mikrosatelliten und deren Alterationen.....	7
1.4. Mikrosatellitenalterationen und Tumoren.....	7
1.4.1. Mikrosatellitenalterationen in Kolontumoren.....	8
1.4.2. Mikrosatellitenalterationen in freier DNA	8
1.4.3. Mikrosatellitenalterationen bei Colitis ulcerosa-assoziierten Kolontumoren.....	9
1.5. Zielsetzungen.....	10
2. Patienten, Material und Methoden	11
2.1. Patienten.....	11
2.2. Blut- und Stuhlgewinnung.....	11
2.2.1. Blutproben.....	11
2.2.1.1. Serum-Isolation.....	11
2.2.1.2. Lymphozyten-Isolation.....	12
2.2.2. Stuhlproben.....	12
2.3. DNA-Isolation.....	12
2.3.1. DNA-Isolation aus Serum.....	12
2.3.1.1. Etablierte Methode der DNA-Isolation aus Serum.....	12
2.3.2. DNA-Isolation aus Lymphozyten.....	13
2.3.2.1. Vorarbeiten zum Proteinase K-Verdau für Lymphozyten und Stuhlproben.....	13
2.3.2.2. Etablierte Methode der DNA-Isolation aus Lymphozyten.....	14
2.3.3. DNA-Isolation aus Stuhl.....	15
2.3.3.1. Vorarbeiten für die DNA-Isolation aus Stuhl.....	15
2.3.3.2. Etablierte Methode der DNA-Isolation aus Stuhl.....	17
2.4. Kontroll-Gruppe.....	18
2.4.1. Materialgewinnung in der Kontrollgruppe.....	18
2.4.2. DNA-Isolation in der Kontrollgruppe.....	18
2.5. Mikrosatellitenanalysen in DNA aus Serum und Stuhl.....	18
2.5.1. Vorarbeiten.....	18
2.5.1.1. Primer-Etablierung.....	18
2.5.1.2. Messen der DNA - Konzentrationen aus den Stuhlproben.....	19
2.5.2. Protokoll der Mikrosatelliten-Analysen.....	21
2.5.2.1. Radioaktive Markierung der Primer	21
2.5.2.2. Polymerase-Kettenreaktion.....	21
2.5.2.3. Vorbereitung zur Elektrophorese.....	22
2.5.2.4. Elektrophorese.....	22
2.5.2.5. Autoradiographie.....	22
2.5.3. Erfassen klinischer und laborchemischer Parameter.....	23
3. Ergebnisse.....	24
3.1. Auswahl der Mikrosatelliten	24
3.2. Isolations- und Analysemethoden.....	25
3.2.1. Ergebnisse der Vorarbeiten.....	25

3.2.1.1. Proteinase K -Verdau.....	25
3.2.1.2. DNA-Isolation aus Stuhl.....	28
3.2.1.3. Mikrosatellitenanalysen in der Kontrollgruppe.....	28
3.2.2. Ergebnisse der DNA-Isolation aus Serum und Stuhl.....	28
3.2.2.1. Isolation von freier DNA aus Serum	28
3.2.2.2. Humane DNA aus Stuhlproben	29
3.2.3. Ergebnisse der Mikrosatellitenanalysen aus Serum- und Stuhl-DNA.....	30
3.2.3.1. Freie DNA aus Serum.....	30
3.2.3.2. Humane DNA aus Stuhlproben.....	32
3.2.4. Mikrosatellitenalterationen in Serum-DNA und klinische Charakteristika	33
4. Diskussion.....	35
4.1. Etablierung einer Methode zur DNA-Isolation aus Serum und Stuhl.....	35
4.2. Standardisierung der Analyse von Mikrosatellitenalterationen.....	39
4.3. Mikrosatellitenanalysen bei Patienten mit Colitis ulcerosa.....	42
5. Zusammenfassung.....	45
6. Literaturverzeichnis.....	46
7. Abkürzungsverzeichnis.....	54
8. Danksagung.....	56
9. Erklärung	57
10. Lebenslauf.....	58

1. Einleitung

1.1. Colitis ulcerosa und das erhöhte Karzinomrisiko

Patienten mit Colitis ulcerosa haben ab dem zehnten Jahr nach Erkrankungsbeginn ein gegenüber der Normalbevölkerung um 0,5-1 % pro Jahr erhöhtes Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Kappelman MD, 2007). Der konkrete Entstehungsmechanismus des Karzinoms ist Gegenstand der wissenschaftlichen Debatte (Eaden JA et al., 2001). Wahrscheinlich existieren verschiedene Faktoren, die zur Tumorentstehung beitragen. Dazu gehören z. B. das Lebensalter bei Erstmanifestation, eine familiäre Disposition, die Dauer der Erkrankung und die Häufigkeit akuter Schübe (Pohl C et al., 2000).

Patienten mit Colitis ulcerosa stellen bei Weitem keine homogene Erkrankungsgruppe dar. Somit ist es nicht erstaunlich, dass auch das Risiko für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms inhomogen im Patientengut verteilt ist, so dass einige Patienten ein individuell höheres Risiko besitzen als andere. Solange wir keine prädiktiven Faktoren kennen, ist es nicht möglich, die Patienten einer Hoch- oder Niedrigrisikogruppe in Bezug auf eine mögliche Tumorentstehung zuzuordnen.

Es besteht Konsens darüber, dass sich Patienten mit Colitis ulcerosa mit einer Erkrankungsdauer von mehr als acht Jahren alle zwei Jahre einer Koloskopie unterziehen sollten, um die Entwicklung eines Dickdarmkarzinoms so früh wie möglich zu diagnostizieren (Choi PM et al., 1993; Connell WR et al., 1994; Giardiello FM et al., 1993; Jablonska M., 1995; Karlen P et al., 1998). Die Endoskopie ist derzeit der Goldstandard zur Tumorfrüherkennung im Kolon. Dennoch sind mit ihr Fehlermöglichkeiten verbunden. Problematisch sind vor allem die Detektion von Frühstadien von Karzinomen (Dysplasien) und flach im Schleimhautniveau wachsende Tumoren, die vom Untersucher nur schwer in der entzündlich veränderten Dickdarmschleimhaut zu identifizieren sind (Herszenyi L et al., 2007). Hieraus leitet sich die Notwendigkeit für die Suche nach Methoden mit untersucherunabhängigen Ergebnissen ab, die möglichst Tumorstadien erkennen.

1.2. DNA und Mikrosatelliten

1.2.1. Isolation zellfreier DNA aus dem Serum

Das wissenschaftliche Interesse an im Serum oder Plasma vorhandener DNA hat eine lange Geschichte. Bereits 1948 wurde der Nachweis von Nukleinsäuren in humanem Plasma beschrieben (Mandel und Métais, 1948). In den 1960/70er Jahren untersuchten Wissenschaftler die Eigenschaften der freien Nukleinsäuren und erschlossen hierüber Anwendungsbereiche in Medizin und Molekularbiologie. Einige Gruppen (Leon SA et al., 1977; Shapiro B et al., 1983) forschten über Konzentrationen freier DNA. Das gesamte Gebiet geriet später in Vergessenheit. Erst in den 1990er Jahren, mit der breiten Verfügbarkeit der PCR und dem Nachweis von verschiedenen genetischen Alterationen, erlebte das Interesse an freien Nukleinsäuren eine Renaissance. Nukleinsäuren werden heute als Zielsequenzen für molekulare Analysen eingesetzt. Untersuchungen, die Aussagen zu Fragen des genauen Aufbaus und auch zu eventuellen Besonderheiten, besonders zu Fragen der Stereochemie, machen könnten, fehlen nahezu vollständig. Die physiologische Bedeutung freier DNA ist weiterhin nicht geklärt.

1.2.2. Isolation von DNA aus Gewebeproben

Seit den 1990er Jahren entstanden eine Fülle von Arbeiten über Mikrosatellitenalterationen, die sich mit der Isolation von DNA aus Gewebeproben beschäftigen. Die Arbeiten zeigen eine große Diversität hinsichtlich der Organe, aus denen diese Proben gewonnen wurden. Auch die Erfolge hinsichtlich der Aussagekraft der Analysen streut breit.

1.2.3. Isolation von DNA aus Stuhlproben

Es liegt nahe, DNA-Proben zu analysieren, die aus Material stammen, das dem Ursprungsgewebe des potenziellen Tumors, also der Kolonmukosa, entspringt bzw. mit diesem in engem Kontakt gestanden hat. Die Faeces scheinen hier ein einleuchtender Ansatzpunkt. Hierauf deutet auch die steigende Zahl von Veröffentlichungen zu diesem Thema in den letzten Jahren hin (Bonanno E et al., 2007; Young GP und Cole S, 2007; Kronborg O und Regula J, 2007; Lim SB et al., 2006; Osborn NK und Ahlquist DA, 2005; Traverso G et al., 2002). Auffallend sind jedoch die unterschiedlichen methodischen Ansätze, um eine zur Analyse

geeignete DNA zu isolieren. Ferner fällt auf, dass nur wenige Folgearbeiten aus den einzelnen Arbeitsgruppen existieren. Es ist daher zu vermuten, dass die Reproduzierbarkeit der einzelnen Methoden gering ist.

1.3. Mikrosatelliten und deren Alterationen

Mikrosatelliten gehören in die große Gruppe repetitiver DNA-Sequenzen. Hier unterscheidet man kodierende von nicht kodierender repetitiver DNA. Zur ersten Gruppe gehören die Sequenzen für tRNA, rRNA und die für Histone kodierenden Abschnitte der DNA. Die Gruppe der nicht kodierenden repetitiven DNA kann nach ihrem Verteilungsmuster im Genom in dispers verteilte und tandemartig verteilte DNA-Abschnitte unterschieden werden. Nach der Länge der Motive dieser tandemartigen Wiederholungen (Tandem-Repeats) der letzten Gruppe unterscheidet man Satelliten-DNA mit mehr als 300 Basenpaaren von Minisatelliten-DNA mit neun bis einhundert Basenpaaren und Mikrosatelliten-DNA mit einer Motivlänge von lediglich ein bis sechs Basenpaaren. Mikrosatelliten sind also kurze hochrepetitive Tandem-DNA-Sequenzen. Sie finden sich sowohl in Exons als auch in Introns und sind über das gesamte (humane) Genom verteilt (Weber JL, 1990). Die Größe variiert von etwa 100 bis 250 Basen.

Alterationen dieser DNA-Abschnitte werden entweder als Längenveränderungen (Shifts) oder Heterozygotie-Verlust (LOH) beobachtet: Dies ist möglich, da eine große interindividuelle Variabilität dieser Genabschnitte besteht. Hiermit besitzen Individuen fast immer zwei verschiedene Allele, die sich mittels Gelelektrophorese in hochprozentigen, denaturierenden Polyacrylamid-Gelen darstellen lassen. Bei Verlust eines dieser Allele findet sich ein LOH, bei Mutationen innerhalb des Allels/ der Allele lassen sich Längenveränderungen und damit eine Veränderungen des „Bandenmusters“ als Shift finden. Mikrosatellitenalterationen gelten als integraler Bestandteil in der Entstehung von Tumoren (Mao et al., 1998).

1.4. Mikrosatellitenalterationen und Tumoren

Theoretisch können Mikrosatelliten bei zirkulierenden Nukleinsäuren als klonale Marker zur Tumordetektion in der Diagnostik eingesetzt werden (Anker, 1999). Manche der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikrosatelliten-Marker befinden sich auf chromosomalen

Abschnitten, die Tumorsuppressorgene beherbergen. Allerdings kann man die Alteration dieser Marker nicht schon als Tumormarker bewerten. Vielmehr handelt es sich, solange man das Gen nicht direkt untersucht, lediglich um ein Indiz für eine strukturelle Veränderung in einem bestimmten Abschnitt einer Nukleinsäure. Dies wird besonders durch die Tatsache gestützt, dass Mikrosatellitenalterationen nicht ausschließlich in DNA aus Tumorgewebe gefunden wurden (Wooster R, 1994). Mikrosatellitenalterationen existieren auch in morphologisch normalen Zellen, die sich in Tumornähe befinden (Lininger RA et al., 1998, Tsopanomichalou M et al., 1999, Chang CL et al., 2001). Auch bei Patienten mit nichttumorösen Erkrankungen wie Asthma bronchiale (Laing IA et al., 1998), chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (Siafakas NM, 1999) und dystropher Myotonie (Perini GI, 1999) konnten Mikrosatellitenalterationen nachgewiesen werden. Viele der untersuchten Mikrosatelliten liegen in nicht kodierenden Sequenzen der DNA. Damit sind unmittelbare Veränderungen in bestimmten Genen ausgeschlossen. Hier werden hinsichtlich der Bedeutung für eine Tumorentwicklung indirekte Einflüsse dieser DNA-Abschnitte auf die Regulation von Gentranskriptionen diskutiert (Li YC et al., 2002).

1.4.1. Mikrosatellitenalterationen in Kolontumoren

Hinsichtlich der Analyse von Mikrosatellitenalterationen aus Tumorgewebe bei Patienten mit kolorektalen Tumoren existieren zahlreiche Studien (Jass JR et al., 2006; Woerner SM et al., 2006). Interessant sind Erkenntnisse von unterschiedlichen genetischen Mustern, die phänotypisch mit unterschiedlichen Wachstumsformen des kolorektalen Karzinoms korrelieren. Verschiedene Gruppen veröffentlichten die Beobachtung von Mikrosatellitenalterationen in DNA aus Kolonmukosazellen, die nicht tumorös verändert waren (Brentnall TA et al., 1996, Park WS et al, 1998), was zu den Erkenntnissen an anderen Organen passt.

1.4.2. Mikrosatellitenalterationen in freier DNA

Die Arbeitsgruppe um Anker zeigte, dass mit Tumoren assoziierte genetische Alterationen nicht ausschließlich in Tumorgewebe-DNA gefunden werden (Chen XQ et al., 1996, Anker et al., 1999). Vielmehr fand sie die Veränderungen auch in freier DNA, die aus Blut, Plasma oder

Serum der Patienten mit Tumorerkrankungen isoliert worden war (Übersicht in: Fleischhacker M und Schmidt B, 2007).

1.4.3. Mikrosatellitenalterationen bei Colitis ulcerosa-assoziierten Kolontumoren

Eine japanische Arbeitsgruppe berichtete von Mikrosatellitenalterationen bei Patienten mit einem auf dem Boden einer Colitis ulcerosa entstandenen kolorektalen Karzinom (Suzuki et. al., 1994). In den zu diesem Thema publizierten Arbeiten wurde in den meisten Fällen DNA aus der Kolonmukosa verwendet. Untersucht wurden dabei Fragestellungen zur Pathogenese der Erkrankung (Podolsky DK, 2002). Andere Arbeiten beschäftigten sich mit der genetischen Veränderungen und der Tumorigenese der Erkrankung. Ergebnisse von Mikrosatellitenanalysen an freien Nukleinsäuren bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurden bisher bis auf die eigenen Arbeiten nicht veröffentlicht (Rauh P et al., 2003).

1.5. Zielsetzungen

Die Colitis ulcerosa ist mit einem erhöhten Karzinomrisiko assoziiert. Die Erkrankung verläuft chronisch und die Patienten sind mit zunehmender Erkrankungsdauer auch einem erhöhten Tumorrisiko unterworfen. Wichtig ist die frühzeitige Diagnose eines Tumors, weil nur dann eine kurative Therapie möglich ist. Bei der Tumorentstehung spielen Veränderungen der DNA eine entscheidende Rolle. Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass unter anderem Veränderungen von Mikrosatelliten ein Abbild solcher Veränderungen im Erbgut sind.

Für das sporadische kolorektale Karzinom ist belegt, dass bestimmte Mikrosatelliten bei einem hohen Anteil von Patienten verändert sind. Diese so genannten Mikrosatelliteninstabilitäten konnten sowohl in Tumorgewebe aber auch in freier DNA aus Serum oder Plasma nachgewiesen werden. Ein problematischer Aspekt der Analysen ist die Abhängigkeit von mehreren unterschiedlichen Mikrosatelliten. Das heißt, man muss eine Auswahl mehrerer Mikrosatelliten untersuchen, um sicher zu gehen, dass tumorassoziierte genetische Veränderungen erfasst werden. Außerdem spielt die Heterogenität eines jeden Tumors mit genetisch unterschiedlichen Subpopulationen eine wichtige und bei der Analyse genetischer Veränderungen erschwerende Rolle. Weiterhin ist eine aus der Isolation gewonnene ausreichende DNA-Menge für die Analyse Voraussetzung. Ein drittes Problem besteht darin, dass Mikrosatellitenalterationen auch in nichttumorösem Gewebe (z.B. Lungengewebe bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung) nachgewiesen wurden.

Ziel der Dissertation ist die Erarbeitung einer Methode, mit der Mikrosatellitenalterationen aus freier DNA in Serum und Stuhl bei Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen werden können.

Somit ergeben sich folgende konkrete Aufgabenstellungen:

- Etablierung einer Methode zur DNA-Isolation aus Serum und Stuhl.
- Standardisierung der etablierten Technik zur Analyse von Mikrosatellitenalterationen. Dadurch soll sichergestellt werden, dass eine große Auswahl und Anzahl von Mikrosatellitenalterationen bestimmbar ist.
- Untersuchung, ob bei Patienten mit Colitis ulcerosa Mikrosatellitenalterationen sowohl in der DNA aus Serum als auch aus Stuhl nachweisbar sind.

Diese Fragestellungen stellen einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur molekularen Früherkennung von Dickdarmkarzinomen bei Patienten mit Colitis ulcerosa dar.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

Das untersuchte Material stammt von Patienten aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin (CCM). Die Patienten wurden über das Forschungsvorhaben und die Verwendung der gewonnenen Materialien und Daten anhand eines Dokumentationsblattes ausführlich aufgeklärt und das Einverständnis schriftlich in dem von der Ethikkommission genehmigten Formular fixiert.

Das einzige Einschlusskriterium der Patienten in die Untersuchungen war die Diagnose einer Colitis ulcerosa. Im Zeitraum von 1999 bis 2002 wurden 65 Patienten eingeschlossen. Das mittlere Alter lag bei 45 Jahren (20-70 Jahre). Es konnten 34 (52,3%) Frauen und 31 Männer (47,7%) untersucht werden.

2.2. Blut- und Stuhlgewinnung

2.2.1. Blutproben

Von den 65 Patienten wurden je 10 mL Serum- und EDTA-Blut entnommen. Die Proben wurden anschließend sofort unter Kühlung ins Labor gebracht. Hier wurden sie direkt weiterverarbeitet. Gewonnen wurden aus dem Blutröhrchen nach Zentrifugation Serum und aus dem EDTA-Blut über einen Ficoll-Gradienten Lymphozyten. Die Proben wurden bei -80°C gelagert. In einem zweiten Schritt wurde aus den Materialien DNA isoliert und bei -20°C gelagert.

2.2.1.1. Serum-Isolation

Das wie oben beschrieben angelieferte Serumröhrchen wurde bei 302 x g 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die restlichen Blutbestandteile vom Serum zu trennen. Das Serum wurde abpipettiert und in einem neuen Gefäß bei 984 x g 15 Minuten bei 4°C rezentrifugiert. Das erneut entnommene Serum wurde nun in NUNC CRYO TUBES (Fa. Nalge

Nunc International) zu je 0,5 mL aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.1.2. Lymphozyten-Isolation

Die Lymphozyten wurden aus der EDTA-Blutprobe gewonnen. Nach Abnahme des Plasmas nach der ersten Zentrifugation wurde die untere Phase 1:1 mit 0,9%-iger Natriumchlorid-Lösung auf 20 mL resuspendiert. Je 3 mL Ficoll wurden nun mit je 10 mL dieser Suspension überschichtet. Die Proben wurden nun bei $838 \times g$ für 30 Minuten durch das Ficoll zentrifugiert. Mit einer Pipette erfolgte die Abnahme der Lymphozyten und deren Überführung in ein neues Gefäß. Diese Proben wurden in einem Waschschrift mit 11 mL 0,9%-iger Natriumchlorid-Lösung aufgefüllt und bei $302 \times g$ (Rotanta S, Hettich) für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet mit $600 \mu\text{L}$ 0,9%-iger Natriumchlorid-Lösung resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei $419 \times g$ (Biofuge fresco, Heraeus) für 3 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet bei -80°C bis zur Weiterbearbeitung gelagert.

2.2.2. Stuhlproben

Von 29 Patienten konnten Stuhlproben asserviert werden. Die übrigen Patienten stimmten einer Stuhlgewinnung nicht zu. Die Proben wurden bis zu ihrer Weiterbearbeitung unbehandelt in Plastik-Sammelbehältern bei -80°C gelagert.

2.3. DNA-Isolation

2.3.1. DNA-Isolation aus Serum

2.3.1.1. Etablierte Methode der DNA-Isolation aus Serum

Es wurde je 1 mL Serum mit dem gleichen Volumen Lysepuffer (Qiagen Blood Mini Kit) sowie $100 \mu\text{L}$ (10% des Volumens des eingesetzten Serums) Proteinase K (20 mg/mL) versetzt und für 12-15 Stunden bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von je $1 \mu\text{L}$ Poly-A-RNA als Carrier und 1 mL

100%-igem Ethanol wurden die Proben 2 mal über eine Säule (Qiagen Blood Mini Kit) gegeben. Danach folgten Waschschrirte mit AW1 einmal bzw. AW2 (beide Qiagen Blood Mini Kit) dreimal mit dazwischen liegenden Zentrifugationen (8000 rpm bzw. 13000 rpm Standard-Eppendorf-Zentrifuge, je 1 Minute). Die Säulen wurden dann zweimal mit je 150 µL Elutionspuffer AE (Qiagen Blood Mini Kit) 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA durch Zentrifugation 1 Minute bei 8000 rpm (Standard-Eppendorf-Zentrifuge) eluiert. Nach Überführen in ein neues Eppendorf-Gefäß wurden die Proben bis zum Weitergebrauch bei 4°C (kurzfristiger Gebrauch) bzw. bei -20°C (längere Lagerung) aufbewahrt.

2.3.2. DNA-Isolation aus Lymphozyten

2.3.2.1. Vorarbeiten zum Proteinase K-Verdau für Lymphozyten und Stuhlproben

Für die Analysen von Mikrosatellitenalterationen ist eine proteinfreie DNA notwendig. Hierzu werden die Ausgangsmaterialien (z.B. Serum, Gewebeschnitte und Stuhlproben) einer Proteinase K-Behandlung unterzogen. In verschiedenen Isolationsprotokollen für Nukleinsäuren werden deutlich unterschiedliche Zeiten für diese Behandlung angegeben. Sie schwanken bei vergleichbaren Proteinase K-Konzentrationen zwischen wenigen Minuten und einem Tag. Wenig ist darüber bekannt, ob und wie stark sich dieser Proteinverdau bei den in der Literatur empfohlenen Zeiten auf die Qualität der DNA auswirkt und welche Zeiten wirklich erforderlich sind. Diese Zeitkomponente interessierte uns besonders. Für eine optimale Reaktion ist eine Aktivierungstemperatur von 50 °C nötig. Wenn diese Temperaturen lange einwirken, sind Defragmentierungen der Nukleinsäuren denkbar. Es ging uns vor allem um generelle Qualitätsverluste der DNA. Die Mikrosatellitenanalysen können durch zu kleine Mengen an Template-DNA falsche Ergebnisse liefern. DNA-Verluste sind bei den geringen gewonnenen Mengen durchaus von Relevanz. Die Zeit spielt auch bezüglich der Effektivität einer Methode eine große Rolle: Der Proteinverdau ist (von Fällungsschritten bei verschiedenen Verfahren abgesehen) der zeitintensivste der gesamten Isolation (nach dem Standardprotokoll für die DNA Isolation aus Serum ca. 12 Stunden). Dieser hohe Zeitaufwand führt zu einer Einbuße bei der Effektivität der Methode insgesamt. Uns interessierte also der Einfluss der Zeit des Proteinverdaus mit Proteinase K hinsichtlich der Amplifizierbarkeit und der Qualität der erhaltenen DNA.

In einer Versuchsreihe mit fünf klinisch gesunden männlichen Blutspendern wurde aus Blutproben Serum und Plasma gewonnen. Hiervon wurden je 4500 μL 1:1 mit Lysepuffer (Qiagen) und je 450 μL Proteinase K (Ausgangskonzentration 20 mg/mL) versetzt. Die Proben wurden bei 50°C inkubiert. Es erfolgte die zeitlich gestaffelte Entnahme von je 1800 μL des Ansatzes nach 10, 30, 60, 120 und 240 Minuten. Durch Zugabe in 1800 μL 100%-iges Ethanol wurde die Proteinase-Reaktion gestoppt. Die weitere Isolation der DNA folgte dem unter 2.3.1. beschriebenen Schema. Die Elution der DNA erfolgte mit insgesamt 150 μL Elutionspuffer AE von Qiagen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Amplifizierbarkeit wurde in PCR-Reaktionen mit dem Mikrosatelliten-Marker D2S119 getestet. Für die semiquantitative und semiquantitative Analyse wurden 20 μL von 150 μL der DNA-Suspension unter Vakuum (Speedvak, Fa. UniEquip) für 15 Minuten evaporiert. Die erhaltenen 10 μL wurden mit 3 μL Ladepuffer (Mischung aus: Glycerol, Bromphenol-Blau, Xylencyanol) versetzt und auf nicht denaturierende Polyacrylamid-Gele (6%) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 170 V über 7 Stunden. Zur Visualisierung wurde eine Silberfärbung verwendet (Schlechte et al., 1997).

2.3.2.2. Etablierte Methode der DNA-Isolation aus Lymphozyten

Das bei -80 °C gelagerte Pellet wurde in gefrorenem Zustand mit 500 μL eines frisch zubereiteten Lysepuffers (bestehend aus: 0,1 M NaCl; 0,01 M Tris pH 8; 25 mM EDTA; 5% SDS) versetzt und bis zum Auftauen mit dem Vortexer gemischt. Nach Zugabe von je 15 μL Proteinase K (20 mg/mL) folgte eine Inkubation bei 50 °C für 12 bis 15 Stunden. Die Proben wurden geteilt und mit DEPC⁺-behandeltem destillierten Wasser auf 500 μL aufgefüllt. Es folgte eine Extraktion von Proteinen und Salzen durch Zugabe von je 250 μL Phenol pH 8 und 250 μL Chloroform im ersten bzw. nach Abnahme des Überstandes von 700 μL Chloroform im zweiten Schritt durch Rotieren der Proben bei Raumtemperatur für 40 Minuten und anschließende Zentrifugation (13000 rpm; 5 min; 4 °C, Standard-Eppendorf-Zentrifuge). Der nach Schritt 2 abgenommene Überstand wurde wieder pro Patient zusammengeführt und zur Fällung mit 10 % des Ausgangsvolumens an Lysepuffer mit 5 M Natriumchlorid-Lösung versetzt. Diese Lösung wurde mit 4 mL 100%-igem Ethanol überschichtet. An der entstandenen Grenzfläche konnte die hochmolekulare DNA auf eine Glaspipette aufgewickelt, getrocknet und mit je 1,5 mL 75%igem Ethanol gespült werden. Waren bei der Blutproben-Aufarbeitung zwei Lymphozytenpellets

gewonnen worden, wurde die DNA in 400 µL Tris (10 mM) gelöst, bei der Gewinnung eines Pellets (Annahme der etwa doppelten Menge) wurden 800 µL eingesetzt. Das Lösen erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach der Entnahme der hochmolekularen DNA wurden die Proben gemischt (d.h. homogene Verteilung des Alkohols) und bei 4 °C über Nacht zur Präzipitation kleinmolekularer DNA aufbewahrt. Das durch Zentrifugation (20 min; 4000 x g, Rotanda S, Hettich) und Dekantieren des Überstandes gewonnene Pellet wurde zum Waschen mit 600 µL 75%-igem Ethanol in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 15 Minuten bei 8000 rpm (Standard-Eppendorf-Zentrifuge) rezentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur wurden die Proben in 200 bzw. 100 µL (siehe oben) Tris (10 mM) gelöst. Die DNA-Isolate wurden auf Amplifizierbarkeit getestet, bei positivem Ergebnis wurden hoch- und niedermolekulare DNA pro Patient wieder gemischt und bis zur Weiterverwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.3. DNA-Isolation aus Stuhl

2.3.3.1. Vorarbeiten für die DNA-Isolation aus Stuhl

Die PCR-inhibierenden Substanzen stellen eine große Herausforderung für die Isolationsmethodik dar: Ohne die Überwindung dieser Problematik erhält man zwar in aller Regel DNA – die Amplifizierbarkeit ist jedoch in vielen Fällen erheblich eingeschränkt oder gar nicht gegeben. Während für die DNA-Isolation aus Blut oder Blutkompartimenten inzwischen gut etablierte Isolationsmethoden zur Verfügung stehen, steht man bei der Isolation aus Stuhlproben als Ausgangsmaterial vor mehreren Problemen:

- 1.) Die Zusammensetzung von Stuhl ist starken inter- und intraindividuellen Schwankungen unterworfen.
- 2.) Damit schwankt die Gesamtmenge aber auch die – ja eigentlich entscheidende – Teilmenge humaner DNA erheblich. Das mag ein Grund sein, dass man in der Literatur stark differierende Angaben von 0,1 bis 10% als Anteile humaner DNA an der Gesamt-DNA findet (Traverso et al., 2002 und Klaassen et al., 2003).
- 3.) Letztlich ändert sich mit der wechselnden Zusammensetzung der Stuhlproben auch die Konzentration der auf die PCR und damit auf die Amplifizierbarkeit einwirkenden Substanzen. Besonders die inhibitorisch wirkenden Substanzen spielen hier natürlich eine entscheidende Rolle.

Bei der Isolation von DNA aus Stuhlproben benötigt man also eine Methode, die robust genug ist, um all den entstehenden Herausforderungen gerecht zu werden, ohne größere Mengenverluste an DNA zu riskieren. Problematisch an den derzeit auf dem Markt erhältlichen Stuhl-Isolations-Kits ist zweierlei:

- 1.) Die eingeschränkte Ausgangsmenge (Milligramm-Bereich) führt dazu, dass auch die Mengen an isolierter humaner DNA zur Analyse so gering sind, dass falsche Ergebnisse zu befürchten sind. Entsprechende Berechnungen wurden z.B. von Whitney und Arbeitsgruppe (Whitney et al., 2004) angestellt. Hiernach ist eine Kopien-Zahl von mindestens 500 nötig, um mit hoher Wahrscheinlichkeit (99 Prozent unter der Voraussetzung, dass in 1 Prozent Mutationen in humaner DNA auftreten) genetische Veränderungen zu detektieren. Damit ist die Aussagekraft verschiedener publizierter Studien fraglich, weil sie eben diese DNA-Mengen nicht erreichen. Außerdem muss man die Repräsentativität solch geringer Ausgangsmengen in Zweifel ziehen, machen doch 0,5 bis 1g nur einen Bruchteil der täglichen Gesamtmenge an Stuhl, die ein Mensch ausscheidet, aus.
- 2.) Eine andere Art von Kits benutzt Methoden der „Capture-beat-Isolierung“. Die gewonnene DNA ist zwar hochrein, es werden aber nur bestimmte Sequenzen aus der Gesamt-DNA „herausgefiltert“. Bei Untersuchungen mit einer Auswahl von mehreren DNA-Markern wären also viele Isolationen nötig, was einen zeitlichen und sehr hohen finanziellen Aufwand bedeutet.

All diese Gründe in Zusammenhang mit einer mangelnden Sicherheit der bisher beschriebenen Isolationsmethoden für größere Stuhlmengen ließen uns nach einer Isolationsmethode suchen, die folgende Anforderungen erfüllt:

1. Einsatz von gut handhabbaren Stuhl-Ausgangsmengen im Gramm-Bereich, der auch quantitative DNA-Analysen ermöglicht.
2. Sichere Amplifizierbarkeit in der PCR.
3. Universelle Einsetzbarkeit der gewonnenen DNA für molekulare Analysen (PCR mit verschiedenen Markern, Größenanalysen, Blots etc.).

Auf Details zur Durchführung dieser Versuche wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit hier bewusst verzichtet. Die entscheidenden methodischen Erkenntnisse sind:

- 1.) Die Verwendung von bovinem Serumalbumin im PCR-Ansatz.

- 2.) Die industriell angebotenen Isolations-Kits für DNA aus Stuhlproben liefern amplifizierbare DNA. Die Ausgangsmenge ist jedoch deutlich begrenzt. Damit waren sie für unsere Zwecke ungeeignet.
- 3.) Die Stuhlproben können ohne Vorbehandlung und ohne zusätzlich notwendige Stabilisierungsmedien bei -80°C gelagert werden.

Der Isolationsalgorithmus, der letztlich in unserem Labor eine sicher analysefähige DNA garantierte, ist eine Kombination aus den gewonnenen Erkenntnissen. Im nächsten Kapitel sind die Details dargestellt. Prinzipiell beruht er auf:

- 1.) dem unspezifischen Binden von PCR-Inhibitoren während des Homogenisierens der Stuhlprobe mit Hilfe von Mondamin-Speisestärke,
- 2.) der Verwendung eines industriellen Kits, der ausgangsmengenvariabel und hinsichtlich der DNA-Sequenzen unspezifisch ist und
- 3.) dem unspezifischen Binden von PCR-Inhibitoren im PCR-Ansatz durch Zufügen von bovinem Serumalbumin.

2.3.3.2. Etablierte Methode der DNA-Isolation aus Stuhl

Jeweils 1 g des entsprechenden Stuhls wurde mit 10 mL ASL Puffer (Qiagen) versetzt und 5 Minuten mit dem Vortexer gemischt bis eine möglichst homogene Suspension erreicht war. Die Probe wurde 5 Minuten bei 6000 x g (Sorval RC 3B plus) zentrifugiert und der Überstand nach Dekantieren wiederum 10 Minuten bei 6000 x g (Sorval RC 3B plus) zentrifugiert. Der braun-klare Überstand wurde in ein 50 mL Röhrchen pipettiert und mit 10 mL AL (Qiagen, Blood Maxi Kit) versetzt. Nach Zugabe von 250 µL Proteinase K (20 mg/mL) und Mischen mit dem Vortexer wurden die Proben bei 50°C 4,5 Stunden inkubiert und zwischenzeitlich mehrmals kurz per Vortexer gemischt.

Nun wurde die Probe mit 2 g Mondamin-Speisestärke versetzt und 1 Minute mit dem Vortexer gemischt. Danach erfolgte die Zentrifugation mit 6000 x g (Sorval RC 3B plus) für 10 Minuten. Der Überstand von 17 mL wurde mit 8,5 mL 100%-igem Ethanol (Ausgangsmenge von ASL abzüglich der Volumenverluste durch die Speisestärke-Behandlung) versetzt, mit dem Vortexer gemischt und auf eine DNA-Isolationssäule (Qiagen, Blood Maxi Kit) aufgeladen (2 Schritte,

Zentrifugation 5 Minuten bei 4000 x g, Sorval RC 3B plus). Es folgten Waschschriffe einmal mit AW 1 und dreimal mit AW 2 jeweils 5 mL (Qiagen, Blood Maxi Kit), dreimal je 3 Minuten einmal 15 Minuten mit 6000 x g (Sorval RC 3B plus). Danach erfolgte zweimaliges Eluieren mit je 600 µL AE (Qiagen, Blood Maxi Kit), 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation 10 Minuten 4000 x g (Sorval RC 3B plus). Das Eluat wurde in Eppendorf Röhrrchen umpipettiert und die DNA bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

2.4. Kontroll-Gruppe

Um die bei uns etablierte Nachweismethode zur Detektion von Mikrosatellitenalterationen darauf hin zu prüfen, ob Veränderungen auch bei zufällig ausgewählten, klinisch als gesund klassifizierten Probanden zu finden sind, untersuchten wir das gewählte Marker-Panel (siehe unten) in frei zirkulierender DNA aus Serum von 13 Blutspendern. Diese wurden komplett anonymisiert durch die Blutbank der Charité zur Verfügung gestellt.

2.4.1. Materialgewinnung in der Kontrollgruppe

Die Blutproben der Kontrollgruppe wurden nach den Verfahren, die unter 2.2.1. beschrieben sind, bearbeitet.

2.4.2. DNA-Isolation in der Kontrollgruppe

Die DNA-Isolationen folgten den unter 2.3.1. und 2.3.2. beschriebenen Verfahren.

2.5. Mikrosatellitenanalysen in DNA aus Serum und Stuhl

2.5.1. Vorarbeiten

2.5.1.1. Primer-Etablierung

Die einzelnen Primer-Paare wurden in Polymerease-Ketten-Reaktionen mit humaner Lymphozyten-DNA bei verschiedenen Annealing-Temperaturen, Magnesium-Konzentrationen

und Zykluszahlen (der PCR) getestet. Die letztlich etablierten Bedingungen für jedes Primer-Paar sind in Tabelle 2 dargestellt.

2.5.1.2. Messen der DNA - Konzentrationen aus den Stuhlproben

Die DNA-Proben aus Stuhl sowie die korrespondierenden DNA-Proben aus den Lymphozyten der gleichen Patienten (siehe oben) wurden per quantitativer PCR über Retrovirus-DNA mittels TaqMan Technik quantifiziert und gleichzeitig auf Amplifizierbarkeit getestet (genaue Beschreibung der Technik und der etablierten Bedingungen bei: Schmidt B et al., 2005). Danach erfolgte die Herstellung entsprechender Verdünnungen – vor allem der hochkonzentrierten Lymphozyten-DNA – um möglichst vergleichbare DNA-Mengen in der PCR zur Mikrosatellitenanalyse einsetzen zu können (siehe hierzu Tabelle 1).

Tabelle 1: Ergebnisse der DNA-Konzentrationsmessungen per TaqMan.

<i>Patienten</i>	<i>WBC-DNA [n Kopien]</i>	<i>Volumen PCR WBC -DNA [μL]</i>	<i>Stuhl-DNA [n Kopien]</i>	<i>Volumen PCR Stuhl-DNA [μL]</i>
1	5239	1	28	4
6	1022	1	40	4
37	1520	1	82	4
54	1452	1	77	4
56	1500	1	283	4
57	1359	1	31	4
60	1085	1	507	2
11	567	2	245	2
14	1085	2	5560	2
15	17	2	22	2
17	93	2	8	4
18	913	2	1323	2
19	194	2	2103	2 (1:10)
21	560	2	4713	2 (1:10)
26	1057	2	120480	2 (1:100)
28	289	2	325	2
30	435	2	3499	2 (1:10)
36	1541	2	38878	2 (1:10)
41	1114	2	2740	2
42	4713	2	268248	2 (1:100)
43	800	2	5824	2 (1:10)
46	21	2	18	2
51	1263	2	87710	2 (1:100)
55	2337	2	14414	2 (1:10)
58	6389	2	282825	2 (1:100)
61	49	2	138441	1 (1:1000)
20	2986	2 (1:1000)	3	2
16	ausgefallen	ausgefallen	122	ausgefallen
32	341	ausgefallen	ausgefallen	ausgefallen

Die Tabelle gibt die DNA-Menge der gewonnenen Stuhl-DNA im Vergleich zur korrespondierenden DNA, die aus Lymphozyten gewonnen wurde, wieder. Auf dieser Basis erfolgte gegebenenfalls die Verdünnung der Proben (Verhältnis in Klammern in Spalten 3 und 5) vor der Mikrosatellitenanalyse, um möglichst vergleichbare Ausgangsmengen an Lymphozyten- und Stuhl-DNA einsetzen zu können und so Fehler bei der Beurteilung auf LOH zu vermeiden. Die Kopienzahlen sind aus gemessenen Ct-Werten (hier nicht angegeben) berechnete Größen.

2.5.2. Protokoll der Mikrosatelliten-Analysen

2.5.2.1. Radioaktive Markierung der Primer

In allen Analysen wurde der 5'(sense)-Primer durch eine T4-Kinase-Forward-Reaktion mit ^{32}P aus γATP markiert. Die hierzu angesetzte Markierungsreaktion mit einem Endvolumen von $20\mu\text{L}$ war wie folgt zusammengesetzt: 1x Forward Puffer (Gibco), T4-Kinase (Gibco) $1\text{U}/\mu\text{L}$, 5'(sense) Primer $0,016\text{ pmol}/\mu\text{L}$ Mastermixvolumen, γATP (Amersham) $20\text{-}40\text{kBq}$ pro Probe, Aqua destillata ad $20\mu\text{L}$. Die Markierungsreaktion wurde 60 Minuten im beheizten Wasserbad bei 37°C inkubiert, die T4-Kinase durch Kochen in einem Wasserbad für 2 Minuten denaturiert und dem vorbereiteten Mastermix für die PCR zugesetzt.

2.5.2.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die Reagenzien zur PCR wurden pro Primerpaar als Mastermix unter Reinstluftatmosphäre in einer Laminar-Flow-Box angesetzt. Aus technischen und Sicherheits-Gründen erfolgte die Zugabe des Markierungsansatzes und der TaqGold-Polymerase (Applied Biosystems, Fa. Perkin Elmer) erst unmittelbar vor dem Zupipettieren der Templates im Radionuklid-Labor.

Die PCR Ansätze wurden in einem Endvolumen von $25\mu\text{L}$ unter den Bedingungen: $1,5\text{ mM Mg}^{2+}$, $60\text{ }\mu\text{M}$ dNTP Mix (Amersham), $0,4\text{ pmol}$ pro Primer, 1 U TaqGold-Polymerase (Applied Biosystem, Fa. Perkin Elmer) etabliert. Die für alle Primerpaare zuvor optimierten Annealing-Temperaturen sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Die PCR wurde in Thermo-well Platten (95 well-Format) und entsprechendem Cycler (Applied Bio System, Fa. Perkin Elmer) durchgeführt. Es wurden jeweils von der Serum-DNA $2\text{ }\mu\text{L}$ und von der Lymphozyten-DNA $1\text{ }\mu\text{L}$ als Template eingesetzt. Die Reaktionen folgten dem Schema: 5 Minuten 95°C zur Aktivierung der Taq-Gold-Polymerase; 40 mal: 30 Sekunden bei entsprechender Annealing-Temperatur; 30 Sekunden 72°C als Extensionsschritt; zuletzt 5 Minuten bei 75°C als abschließendem Extensionsschritt. Die Proben wurden dann auf 4°C gekühlt.

2.5.2.3. Vorbereitung zur Elektrophorese

Nach der PCR wurden die Proben unter Vakuum (Speedvak, Fa. UniEquip) innerhalb einer Stunde getrocknet (keine sichtbaren Flüssigkeitsrückstände mehr) und die Produkte dann in je 10 µL Formamid plus Bromphenolblau und Xylencyanol gelöst und bis zur Elektrophorese bei – 20°C gelagert.

2.5.2.4. Elektrophorese

Die aus den PCR gewonnenen Produkte wurden in 6%-igen, denaturierenden Harnstoff / Formamid-Polyacrylamid-Gelen (5,6 M Harnstoff; 7,1 M Formamid [Firma Roth]) aufgetrennt. Die Laufzeiten der Produkte richteten sich nach der zu erwartenden Produkt-Größe und lagen zwischen 3 und 6 Stunden. Im ersten Gel der jeweiligen PCR-Produkte wurden 4 µL der Serum-DNA-Produkte bzw. 2 µL der Lymphozythen-DNA-Produkte bei den Stuhl-DNA-Analysen je 2 µL eingesetzt. Um das Produkt aus der Serum-DNA auch auf Heterogenitätsverluste (LOH) beurteilen zu können wurden, je nach Ergebnis aus dem ersten Gel, die eingesetzten Mengen an Serum- bzw. Lymphozyten-DNA-Produkten auf einem zweiten Gel so variiert, dass eine möglichst identische Schwärzung auf dem Röntgenfilm (siehe auch unten) erreicht wurde.

2.5.2.5. Autoradiographie

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele 10 Minuten in einer Methanol/Essigsäure-Lösung (Gemisch auf Basis von destilliertem Wasser mit: 18,75% Methanol; 6,25% Essigsäure, Endvolumen 3,2L) fixiert, auf Filterpapier aufgezogen und für zwei bis drei Stunden unter Vakuum (Speedvak, Fa. UniEquip) vollständig getrocknet.

Danach wurde ein Röntgenfilm (X-ray Retina, FR 50; Fa. Fotochemische Werke Berlin-Köpenick) auf das Gel aufgelegt und über Nacht exponiert (bei schwacher radioaktiver Markierung der Produkte erfolgte eine entsprechend längere Folgeexposition). Der Röntgenfilm wurde maschinell entwickelt und die produktäquivalenten Schwärzungen auf einem Röntgenbild-Betrachter visuell, d.h. nicht automatisch, ausgewertet.

2.5.3. Erfassen klinischer und laborchemischer Parameter

Durch die Auswertung der entsprechenden Klinik- und Poliklinik-Akten konnten bei allen Patienten, die Mikrosatellitenalterationen aufwiesen, die folgenden Daten erfasst werden:

- endoskopisch nachgewiesene Lokalisation der Kolitis (Proktitis, Linksseitenkolitis, Pankolitis),
- Dauer der Erkrankung,
- Laborparameter: C-reaktives Protein, Leukozyten- und Thrombozyten-Zahl.

Ausgewertet wurden die Akteneintragungen in einem Zeitraum sechs Monate vor und nach der Blutentnahme, aus der die DNA zur Mikrosatellitenanalyse isoliert wurde. Existierten bei den Laborparametern mehrere Werte, wurde zur Auswertung der Mittelwert verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Auswahl der Mikrosatelliten

Per Literatur-Recherche wurden Mikrosatelliten für unsere Untersuchungen ausgewählt, deren Veränderungen gehäuft beim sporadischen kolorektalen Karzinom beschrieben worden waren. Hierbei wurden auch die Mikrosatelliten berücksichtigt, die für die Klassifikation des sporadischen kolorektalen Karzinoms in Mikrosatelliten-stabile und -instabile Tumoren Verwendung finden (Boland et al., 1998). Tabelle 2 gibt die Eigenschaften dieser Mikrosatelliten-Auswahl wieder.

Tabelle 2: Charakteristika der in den Mikrosatellitenanalysen verwendeten Primer.

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Chromosomale Lokalisation</i>	<i>Annealing Temperatur [°C]</i>	<i>Produkt-Größe [bp]</i>
D2S119	CA Dinucleotid-Repeat	2p21	56	156
D17S261	CA Dinucleotid-Repeat	17p12	56	157-171
D5S346	CA Dinucleotid-Repeat	5q21	64	(99-121) 137
D7S481	CA Dinucleotid-Repeat	7p22	56	179
D3S1289	CA Dinucleotid-Repeat	3p21.2	56	178
D13S175	CA Dinucleotid-Repeat	13q11	55	(103-113) 115
D2S123	CA Dinucleotid-Repeat	2p16	55	(197-227) 227
D12S90	CA Dinucleotid-Repeat	12p13	55	(166-182) 174
BAT-25	poly T	4q12	56	124
BAT-40	poly T	1p13.1	56	127
BAT-26	poly A	2p16	58	121

3.2. Isolations- und Analysemethoden

3.2.1. Ergebnisse der Vorarbeiten

3.2.1.1. Proteinase K -Verdau

Es wurden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zeiten (10, 30, 60, 120 und 240 Minuten) festgestellt. Das heißt, dass auch ein kürzerer Proteinase K-Verdau zu vergleichbar guter Amplifizierbarkeit der Template-DNA führt. Während sich die Konzentrationen der aus dem Serum isolierten DNA zwischen 466 ng/ml und 345 ng/mL bewegen, findet man im Plasma Konzentrationen zwischen 94 ng/mL und 62 ng/mL. Die einzelnen Ergebnisse sind in der Abbildung 1 in einem Diagramm zusammengefasst.

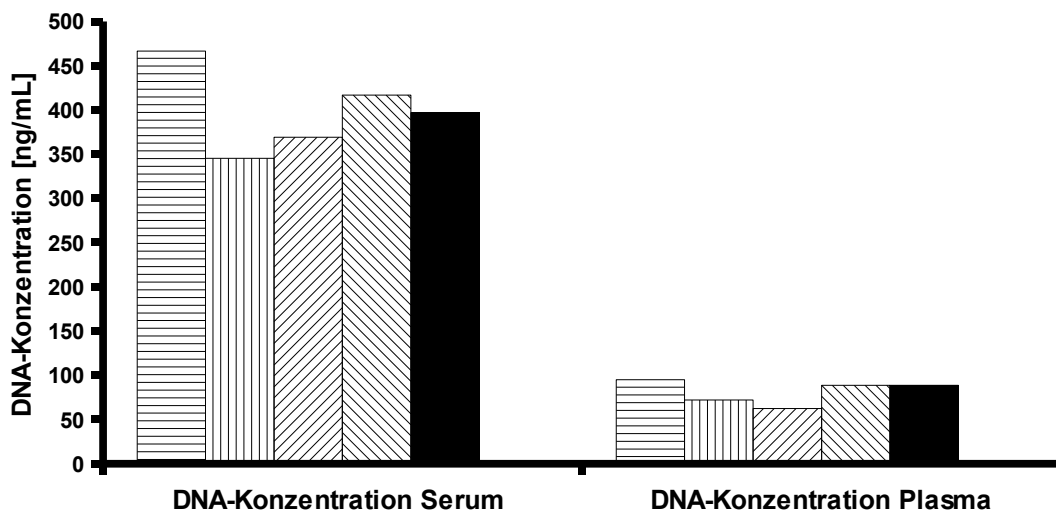


Abbildung 1: DNA-Konzentrationen in Plasma und Serum nach unterschiedlichen Zeiten der Proteinase K-Behandlung.

Die Messungen erfolgten per LightCycler-System und wurden durch das Forschungslabor der Klinik für Urologie der Charité durchgeführt. Die unterschiedlichen Muster stehen für die verschiedenen Zeiten der Proteinase K-Behandlung: Querstreifen 10 Minuten, Längsstreifen 30 Minuten, schräg von links unten 60 Minuten, schräg von rechts unten 120 Minuten, schwarz 240 Minuten.

Um eventuelle semiquantitative und qualitative Unterschiede der DNA nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten darzustellen, wurde die entsprechende DNA durch Elektrophorese aufgetrennt. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 2. Hier findet man DNA in allen auf dem Gel dargestellten Größenbereichen von 145 bp bis > 1116 bp bei allen – unterschiedliche Zeiten repräsentierenden – Proben. Unterschiede zwischen Plasma und Serum lassen sich hier nicht erkennen. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Reaktionszeit beim Proteinase K-Verdau von 240 Minuten auf 10 Minuten vergleichbare Resultate liefert.

Die hier gewonnene Erkenntnis wurde in die verkürzte Proteinase-Reaktion bei der Isolation der DNA aus Stuhlproben eingebracht. Auf eine Veränderung des Isolationsschemas bei den Serumproben wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit verzichtet, da ein Großteil der Proben ohne diese Erkenntnisse bereits isoliert worden war.

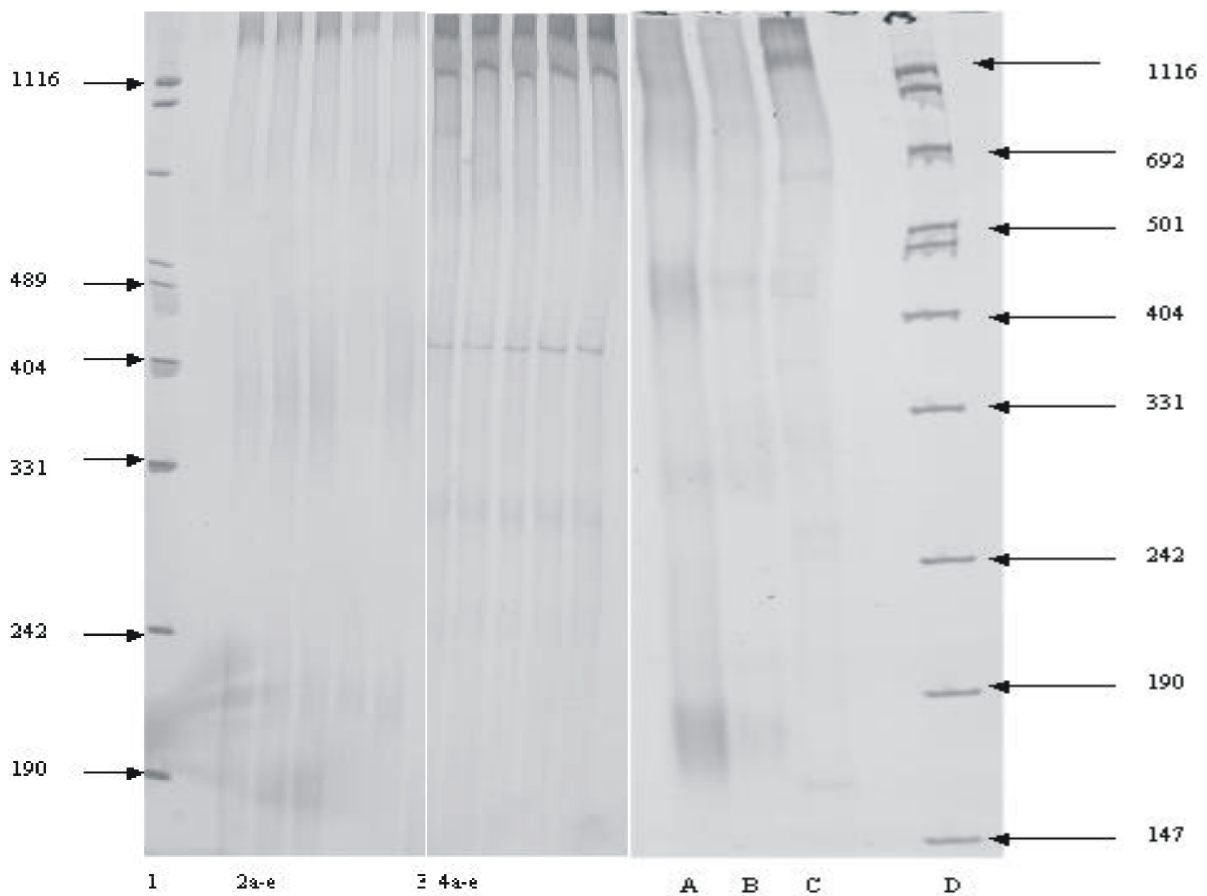


Abbildung 2: Einfluss der Dauer der Proteinase K-Behandlung auf die Qualität der isolierten DNA. Dargestellt als Fotografie der Polyacrylamidgele nach Silberfärbung. Die Zahlen links und rechts stehen für die Größe der mit gelaufenen Markerbanden (Bahnen 1 und D) in Basenpaaren. 2 steht für die Serum-DNA, 4 für die Plasma-DNA. a-e geben die Bahnen der DNA mit jeweils unterschiedlicher Zeit der Proteinase K-Behandlung wieder (a: 10 min, b: 30 min, c: 1h, d: 2h, e: 4h. A, B und C stehen für Spuren mit gelaufener Lymphozyten-DNA zum Vergleich).

3.2.1.2. DNA-Isolation aus Stuhl

Die Ergebnisse dieser Vorarbeiten schlagen sich in der Methodik und dem Finden eines geeigneten Isolationsschemas nieder und sind so im Methoden-Teil dargestellt.

3.2.1.3. Mikrosatellitenanalysen in der Kontrollgruppe

Alle Proben der frei zirkulierenden DNA aus Serum waren für alle Marker amplifizierbar. In keiner der Proben der Kontroll-Gruppe konnten Mikrosatelliten-Alterationen mit dem von uns verwendeten Panel nachgewiesen werden.

3.2.2. Ergebnisse der DNA-Isolation aus Serum und Stuhl

3.2.2.1. Isolation von freier DNA aus Serum

Wie oben erwähnt, konnte von 65 Patienten DNA mit der unter 2.3.1. beschriebenen Methodik isoliert werden. In 59 Fällen war eine Amplifikation der 11 ausgewählten Mikrosatellitenmarker möglich. Bei 6 Proben misslang die Amplifikation der gewonnenen DNA oder es lagen keine Vergleichs-DNA-Proben aus Lymphozyten vor.

Bei allen Markern kam es bei unterschiedlichen Patienten und in unterschiedlicher Häufigkeit zu Ausfällen bei der PCR. Konnten auch nach der Wiederholung der PCR keine Ergebnisse erzielt werden, wurde dieses als nicht definiert (n.d.) gewertet. Die genauen Resultate für die einzelnen Mikrosatellitenmarker sind in Tabelle 3 dargestellt. In einem Kappa-Korrelationstest konnte für die Patientenserie kein Zusammenhang zwischen den ausgefallenen Markern und bestimmten Patienten festgestellt werden. Die Ausfälle beruhen also auf Zufall.

Tabelle 3: Statistik Primerpanel Serum-Screening.

<i>Primer</i>	<i>n</i>	<i>nd</i>	<i>neg</i>	<i>pos</i>	<i>pos/(n-nd)</i> [%]
D2S119	59	0	59	0	0
D17S261	59	6	52	1	2,0
D5S346	59	6	52	1	2,0
D7S481	59	4	53	2	4,0
D3S1289	59	1	54	4	7,0
D13S175	59	2	57	0	0
D2S123	59	2	55	2	3,0
D12S90	59	0	55	4	7,0
BAT-25	59	0	59	0	0
BAT-40	59	4	55	0	0
BAT-26	59	1	58	0	0

Die Tabelle zeigt die eingesetzten Primer und die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalysen der aus Serum gewonnenen DNA-Proben.

n die Gesamtzahl der untersuchten Proben.

nd ist die Anzahl der Proben, die bei der Untersuchung ausfielen.

neg die Anzahl der Proben, bei denen keine Mikrosatellitenalteration gefunden wurde.

pos die Anzahl der Proben bei denen eine Mikrosatellitenalteration gefunden wurde.

Die letzte Spalte gibt den Prozentsatz an Proben mit Mikrosatellitenalterationen bezogen auf die Zahl der untersuchbaren Proben an.

3.2.2.2. Humane DNA aus Stuhlproben

In dieser Arbeit konnten Stuhlproben von 29 der 59 Patienten mit Colitis ulcerosa, bei denen auch DNA aus Serum und Lymphozyten isoliert worden war, gewonnen werden. Bei 27 dieser 29 Proben konnte zuverlässig mit der unter 2.3.3. beschriebenen Methodik DNA isoliert werden. Bei zwei Proben war eine Amplifikation von PRC-Produkten auch nach zusätzlichen Reinigungsversuchen (Phenol/ Chloroform) nicht möglich.

Während der Versuchsserie mit den Mikrosatellitenmarkern kam es zu gelegentlichen zufälligen Ausfällen einzelner Proben. Waren diese auch nach einem nochmaligen Amplifikationsversuch ohne Ergebnis, so wurden diese Fälle als nicht definiert (n.d.) gewertet. Eine genauere Übersicht zeigt die Tabelle 4.

Tabelle 4: Statistik Primerpanel Stuhl-Screening.

Primer	n	nd	neg	pos	pos/(n-nd) [%]
D2S119	27	0	27	0	0
D17S261	27	1	25	1	3,8
D5S346	27	1	25	1	3,8
D7S481	27	0	24	3	11
D3S1289	27	0	24	3	11
D13S175	27	0	25	2	7,4
D2S123	27	0	23	4	14,8
D12S90	27	0	25	2	7,4
BAT-25	27	0	27	0	0
BAT-40	27	0	26	1	3,7
BAT-26	27	0	27	0	0

Die Tabelle zeigt die eingesetzten Primer und die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalysen der aus Stuhl gewonnenen DNA-Proben.

n die Gesamtzahl der untersuchten Proben.

nd die Anzahl der Proben, die bei der Untersuchung ausfielen.

neg die Anzahl der Proben, bei denen keine Mikrosatellitenalteration gefunden wurde.

pos die Anzahl der Proben bei denen eine Mikrosatellitenalteration gefunden wurde.

Die letzte Spalte gibt den Prozentsatz an Proben mit Mikrosatellitenalterationen bezogen auf die Zahl der untersuchbaren Proben an.

3.2.3. Ergebnisse der Mikrosatellitenanalysen aus Serum- und Stuhl-DNA

3.2.3.1. Freie DNA aus Serum

Sieben von 59 (11,8 %) Patienten wiesen in mindestens einem Marker Mikrosatellitenalterationen auf. Hierbei zeigten sich bei 5 Patienten Mikrosatellitenalterationen in einem Marker, bei zwei Patienten waren jeweils 4 der untersuchten 11 Marker alteriert.

In den Mikrosatellitenmarkern BAT-25, BAT-26, BAT-40, D2S119 und D13S175 konnten bei keinem Patienten Veränderungen gefunden werden. Andererseits zeigte der Marker D12S90 bei 4 von 7 (57 %) Patienten mit Mikrosatellitenalterationen eine Veränderung. Die genauen Daten der Mikrosatellitenalterationen in Bezug auf die Patienten sind in der Abbildung und Tabelle 3 zusammengefasst.

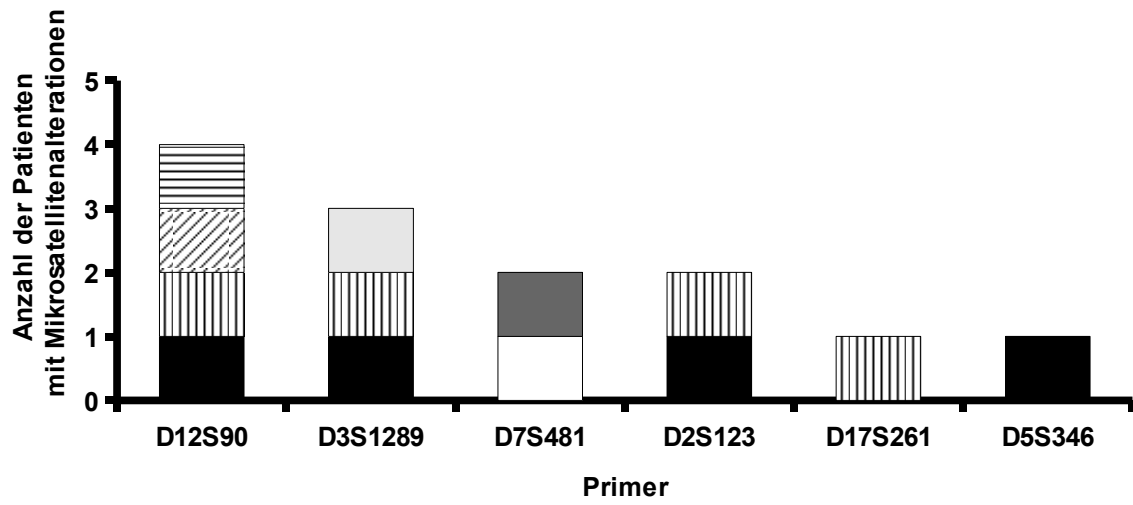


Abbildung 3: Patienten und Primer mit Mikrosatellitenalterationen in Serum-DNA.
Die unterschiedlichen Muster stehen für die einzelnen Patienten.

3.2.3.2. Humane DNA aus Stuhlproben

Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalysen mit dem gleichen Marker-Panel wie bei den Serum-DNA-Analysen (siehe auch Tabelle 2), sind in Abbildung und Tabelle 4 dargestellt. Bei 9 von 27 Patienten (33%) fanden sich in mindestens einem Marker Alterationen. In einem Fall (Patient 54) fand sich eine Mikrosatellitenalteration in Stuhl- und Serum-DNA im Marker D3S1289. Bei den anderen Patienten, die Mikrosatellitenalterationen in der Stuhl-DNA aufwiesen, waren keine Alterationen in der freien Serum-DNA gefunden worden. In den Markern D2S119 und BAT 25, BAT 26 konnten wie in den Serum-DNA-Analysen keine Alterationen gefunden werden. Im Gegensatz zu den Serum-DNA-Analysen konnten in den Markern D13S175 und BAT 40 Alterationen detektiert werden.

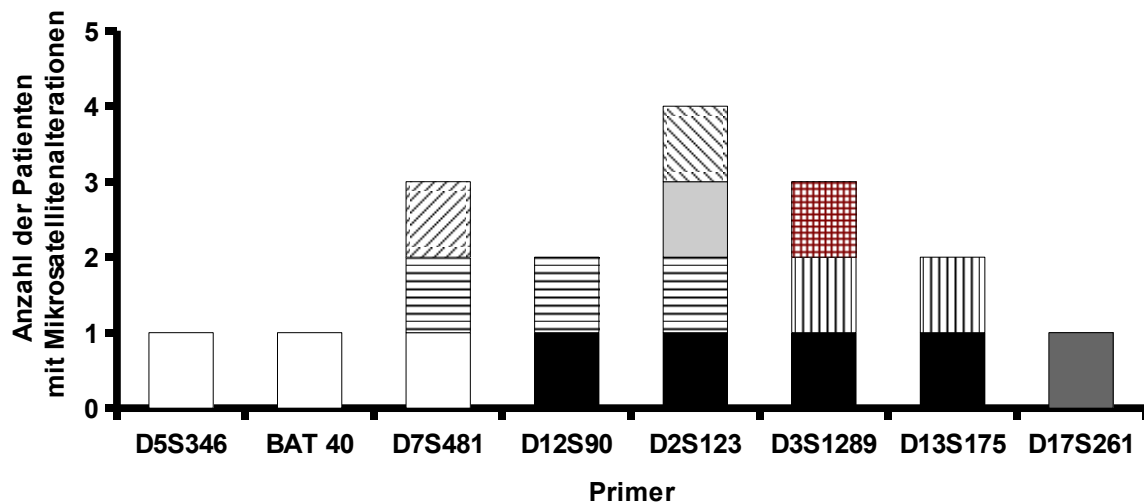


Abbildung 4: Patienten und Primer mit Mikrosatellitenalterationen in Stuhl-DNA.
Die unterschiedlichen Muster stehen für die einzelnen Patienten.

3.2.4. Mikrosatellitenalterationen in Serum-DNA und klinische Charakteristika

Sechs der sieben auf Mikrosatellitenalterationen im Serum positiv getesteten Patienten zeigten eine Erhöhung der mittleren CrP-Konzentration (normal 8 mg/L), Ausnahme war Patient 14. Alle Patienten hatten mittlere Leukozytenzahlen im Normbereich. Ein Patient (44) zeigte eine erhöhte mittlere Thrombozytenzahl (normal bis $400 \times 10^6/L$). Bezogen auf die Dauer und die Ausbreitung der Colitis ulcerosa bei den für Mikrosatellitenalterationen positiv getesteten Patienten fanden wir keinen Zusammenhang zur Zahl der Mikrosatellitenalterationen. Die genauen Daten zeigen Tabelle und Abbildung 5.

Tabelle 5: Klinische Daten der Patienten mit Mikrosatellitenalterationen.

<i>Patienten-ID</i>	<i>Erkrankungsdauer [Jahre]</i>	<i>Ausbreitung der Kolitis</i>
44	13	Pan-Kolitis
54	2	Links-Seiten-Kolitis
48	4	Pan-Kolitis
14	4	Proctitis ulcerosa
52	6	Links-Seiten-Kolitis
18	3	Pan-Kolitis
64	40	Pan-Kolitis

Gezeigt ist die Erkrankungsdauer und die Ausbreitung der Kolitis der Patienten, die in den Untersuchungen mindestens eine Mikrosatellitenalteration aufwiesen. Die Erkrankungsdauer wird in Jahren von der Erstdiagnose bis zum Entnahmezeitpunkt der analysierten Blutprobe angegeben. Die Angabe der Ausbreitung der Kolitis erfolgte dreigeteilt entweder als Proctitis ulcerosa nur bei Befall des Rektums, als Links-Seiten-Kolitis bei einer Entzündung bis zur linken Kolon-Flexur oder als Pankolitis bei Entzündungen über die linke Kolon-Flexur hinaus.

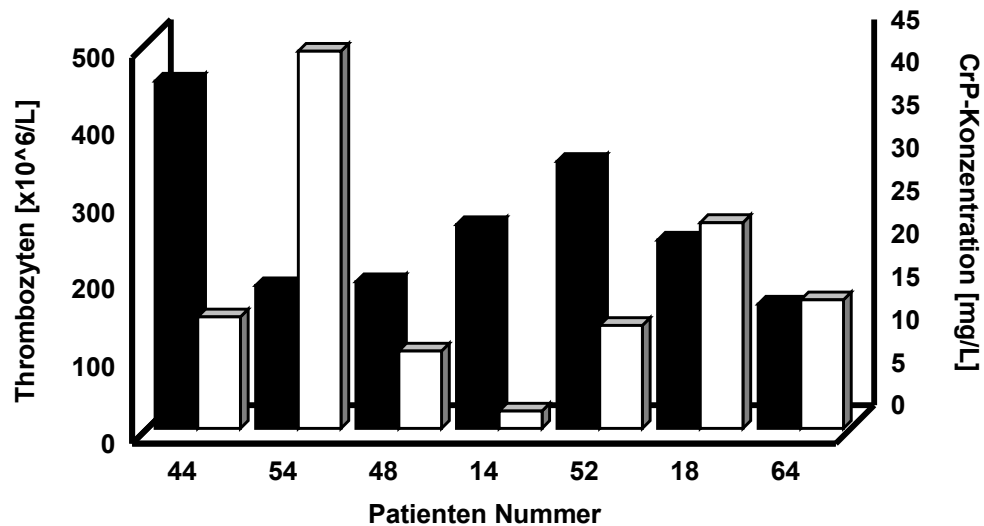


Abbildung 5: Mittlere Thrombozytenzahlen (schwarze Säulen) und CrP-Konzentrationen (weiße Säulen) bei Patienten mit Mikrosatellitenalterationen.

Die Ergebnisse wurden per Analyse der Krankenblätter und Berechnung des Mittelwertes von Laborwerten erstellt, die in einem Zeitraum von einem Jahr um die Serumentnahme zur Mikrosatellitenanalyse erfasst worden waren.

4. Diskussion

4.1. Etablierung einer Methode zur DNA-Isolation aus Serum und Stuhl

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeichnen ein sehr differenziertes Bild der Gewinnung von DNA zur molekularbiologischen Analyse. Grundsätzlich wurde mit der Arbeit gezeigt, dass für jedes Ausgangsmaterial, sei es nun Serum, Gewebeschnitt oder Stuhl, eine standardisierbare Methode zur DNA-Isolation entwickelt werden kann. Hilfreich war hier die Orientierung an allgemein bekannten und anerkannten Isolationsmodi. Dieses Vorgehen beinhaltet auch die Verwendung kommerziell verfügbarer Isolations-Kits.

Eine gute Target-DNA sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen:

1. ausreichende Menge zur Vermeidung von Artefakten bei der Mikrosatellitenanalyse sowie eine ausreichende Größe der isolierten DNA-Fragmente (die Masse an isolierter DNA sollte nicht kleiner als 150 Basenpaare sein, um sie in einer PCR noch effektiv amplifizieren zu können),
2. ausreichende Reinheit zur Vermeidung von schlechten PCR-Ergebnissen durch Inhibitoren.

Das Erreichen dieser Ziele ist differenziert nach den Ausgangsmaterialien zur DNA-Gewinnung zu sehen.

Bei den Gewebeschnitten ist die gewonnene DNA-Menge das Hauptproblem. Zwar wurden durch uns keine quantitativen Bestimmungen durchgeführt, weil insgesamt viel zu wenig Ausgangsmaterial vorhanden war. Die durchgeführten Mikrosatelliten-Analysen zeigten aber nicht reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich der Mikrosatellitenalterationen. Insgesamt scheint es ausgesprochen schwierig zu sein, aus einzelnen Zellverbänden genügend Material zu gewinnen, um nicht Ergebnisse zu erhalten, die keine Artefakte darstellen. Systematisch haben sich mehrere Arbeitsgruppen mit dieser Artefaktentstehung beschäftigt (Diaz-Cano SJ 2001, Sieben N et al. 2000, Hynn JS et al. 2002). Weil keine konsistenten Ergebnisse bei den Versuchen mit Paraffinschnitten zu erreichen waren und außerdem weil von viel zu wenigen unserer Patienten mit Colitis ulcerosa überhaupt Gewebeproben verfügbar waren, wurden nach

anfänglichen DNA-Isolationen diese Analysen von uns nicht weiter verfolgt. Dennoch existieren Arbeiten von mikrodisezierten Zellen und Mikrosatellitenanalysen auch im Vergleich zu DNA-Analysen mit Serum als Ausgangsmaterial. Diese erfordern jedoch sehr spezielle (Geräte-)Technik und Fertigkeiten (Kölble et al., 1999).

Anders sahen die Bedingungen bei der DNA aus, die aus den Serumproben gewonnen wurde. Auch hier besteht zwar die Gefahr, Artefakte als Ergebnisse der Mikrosatellitenanalysen zu erhalten. Das konsequente doppelte Testen der Ergebnisse dürfte jedoch diesen Fehler weitgehend ausschließen, weil nicht davon auszugehen ist, dass Artefakte in der zur Kontrolle durchgeführten PCR konsistent wieder auftreten.

Ein anderes Problem beschäftigte uns bei der DNA-Isolation aus den Serumproben. Anfangs waren die Proben in den Amplifikationstests häufig schlecht oder gar nicht amplifizierbar. Um eine Qualitätsverbesserung dieser Proben zu erreichen, waren zeitaufwändige Reinigungsschritte notwendig, die außerdem einen Mengenverlust (z.B. beim Umfällen der DNA) bedeuteten. Bei dem insgesamt raren Ausgangsmaterial, das z.T. auch aufwändig zu beschaffen war (nicht alle Patienten leben in Berlin), sind solche Hindernisse nicht akzeptabel. In verschiedenen Publikationen war auf die Problematik einer PCR-Inhibition nach Isolationen von DNA aus Serum mit kommerziellen Kits aufmerksam gemacht worden (Rohland N und Hofreiter M, 2007, Flekna G et al., 2007). Man ist sich einig, dass Salze aus einem der Isolationspuffer hierbei das Hauptproblem darstellen. Die Modifikation des Herstellerprotokolls mit einem häufigeren Waschen der DNA (drei Mal statt ein Mal) brachte in diesem Fall die entscheidende Lösung. Die Proben war ab diesem Zeitpunkt sicher zu amplifizieren.

Insgesamt ist es also mit einigen Veränderungen von Standardverfahren möglich, eine qualitativ hochwertige Target-DNA für Mikrosatelliten-Analysen aus Serum zu gewinnen. So konnte in der Hauptversuchsreihe mit den Proben der Patienten mit Colitis ulcerosa in einem hohen Anteil amplifizierbare DNA gewonnen werden (59 von 65 Proben). Der Anteil von Proben, die nicht amplifizierbar waren, ist mit der Literatur vergleichbar. Die Probenausfälle hatten unterschiedliche Gründe. In einem Teil der Fälle lassen sich diese nur vermuten, wie z.B. DNA-Mengen unterhalb der Nachweisgrenze oder nicht zu beseitigende Verunreinigungen mit PCR-Inhibitoren.

Die Isolation humaner DNA aus Stuhlproben stellte uns vor besondere Herausforderungen. Die Faeces mit ihrer inter- aber auch intraindividuell stark ausgeprägten Diversität in der Zusammensetzung, Menge und Konsistenz machen es schwierig, einen gut standardisierbaren Isolationsalgorithmus zu entwickeln.

Auf dem Markt findet man einige Kits zur DNA-Isolation aus Stuhlproben. Unser Hauptkritikpunkt an all diesen Kits war vor allem die Ausgangsmenge des verwendeten Stuhls. Sie liegt im Milligrammbereich. Wenn man sich jedoch überlegt wie groß die täglich Stuhlmenge des Menschen ist und dass ein geformter Stuhl kein homogenes Gemisch darstellt – wie man das z.B. bei Blut oder Serum konstatieren darf - scheint es erlaubt, an der Repräsentativität einer solch kleinen Ausgangsmenge zu zweifeln. Unser Ziel war es daher, eine Isolationsmethode zur Verfügung zu haben, die möglichst große Ausgangsmengen als Grundlage hat. Mit der Modifikation des Qiagen-Maxi-Kit gelang dies letztlich. Theoretisch kann in mehreren Probengefäßen eine beliebige Stuhlmenge aufgearbeitet werden. Begrenzend dürften hier lediglich die erheblichen Mengen an Isolationsmedien und die damit verbundenen Kosten sein.

Das zweite große Problem bei DNA-Isolaten aus Stuhl ist deren Qualität für die PCR. Die Proben sind nicht ausreichend von verschiedenen Inhibitoren gereinigt, die wegen der so vielfältigen Zusammensetzung auch nicht genau voraussagen sind. Man benötigt also Substanzen, die wie z.B. Aktivkohle, unspezifisch PCR-Inhibitoren binden können. Den Erfolg brachte der Einsatz hochgereinigter Speisestärke (Mondamin) bei der Isolation in Verbindung mit dem Zusatz von bovinem Serum-Albumin zur PCR. Den zusätzlichen stark inhibitorischen Effekt von sehr großen DNA-Mengen konnte man durch ausreichende Verdünnung der Proben erreichen. Die der PCR-Analyse vorgeschaltete Template-DNA-Quantifizierung erwies sich hierbei als solide durchführbares Verfahren. Da über eine quantitative Real-time-PCR gemessen wurde, ergab sich gleichzeitig ein Amplifikationstest (Schmidt et al., 2005). Die einzelnen Möglichkeiten, eine PCR-Inhibition zu überwinden, sind in unterschiedlichen Publikationen beschrieben (Rohland et al., 2007, Bergallo M et al., 2006). Die Kombination verschiedener Strategien brachte in unseren Arbeiten den Erfolg.

Durch die gezielte Verdünnung, die erst durch die vorherige Quantifizierung der DNA möglich wurde, waren bei in den Mikrosatellitenanalysen gesehenen Heterogenitätsverlusten kaum noch Wiederholungs-Elektrophoresen notwendig. Die Analysen der Stuhl-DNA Proben waren so in einem deutlich kürzeren Zeitrahmen zu bewältigen. Der Schwärzungsgrad der anderen Banden des Mikrosatellitenmusters stellte sich nämlich nahezu identisch dar.

Als Nachteile der Methode sollten drei Punkte angesprochen werden:

1. Es ist ein großer Aufwand zur Etablierung der Quantifizierungsmethode notwendig, ferner benötigt man einen Real-time-PCR fähigen Cycler, was mit relativ großen Kosten verbunden ist.
2. Mit der zusätzlichen PCR ist ein zusätzlicher Zeitaufwand notwendig. Allerdings muss man die Stammprobe nur einmal messen und kann die Informationen auch für spätere Versuche nutzen.
3. Es kommt zu einem Materialverlust für die eigentliche Analyse, was bei kleinen Ausgangsmengen durchaus eine Bedeutung haben kann. Bei den Stuhl-DNA-Proben spielte dies aber keine Rolle.

Ein deutlicher Zeitgewinn bei der Isolierung der Stuhl-DNA wurde auch durch die Verkürzung der Proteinase-K-Behandlung erreicht. Dieser Schritt war durch die unter 2.3.2.1. beschriebene Versuchsreihe möglich geworden. Die in den Herstellerprotokollen der Isolations-Kits angegebenen Zeiten scheinen zu reichlich bemessen, wie unser Versuch zeigte.

Insgesamt gelang es uns also, eine effiziente Methode zur Isolation von Stuhl-DNA zu finden. Den Erfolg dieser Methodik unterstreicht der hohe Anteil von amplifizierbaren DNA-Proben aus dem Stuhl der Patienten mit Colitis ulcerosa der Hauptversuchsreihe (27 von 29 Proben konnten analysiert werden). Ein Nachteil der etablierten Methode ist sicher die immer noch notwendige Häufung von zusätzlichen Schritten, um die in der DNA enthaltenen PCR-Inhibitoren zu neutralisieren.

4.2. Standardisierung der Analyse von Mikrosatellitenalterationen

Nur durch eine standardisierte Analysemethode können vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode zur Analyse von Mikrosatellitenalterationen so standardisiert, dass sie unabhängig von der Herkunft der DNA angewendet werden konnte. Bei der Analyse mehrerer Mikrosatellitenmarker besteht schon eine große Diversität durch die Zahl der Marker an sich. Jede Veränderung birgt aber auch die Gefahr von Fehlern. Es scheint deshalb wichtig, den Versuchsaufbau für jeden einzelnen Mikrosatellitenmarker möglichst ähnlich zu gestalten, um bei der Auswertung der Versuche eine große Vergleichbarkeit der Einzelversuche zu gewährleisten. Hinweise auf eine solche Notwendigkeit geben verschiedene Studien (Leclercq S et al., 2007, Olejuiczak M und Krzyzosiak WJ, 2006).

In unseren Versuchsreihen konnten wir dieser Forderung besonders auf der Ebene der PCR in großem Umfang nachkommen. Bis auf die notwendigen unterschiedlichen Annealing-Temperaturen, waren die Bedingungen für alle Mikrosatelliten gleich (Amplifikationsrichtung an der DNA, Zykluszahl, Magnesiumkonzentration). Dies ist insofern bedeutsam, als in der Literatur nicht selten Versuchsreihen mit Mikrosatellitenanalysen beschrieben sind, in denen sich die Parameter stark voneinander unterscheiden, um die Analysen technisch überhaupt möglich zu machen. Jede Veränderung der genannten Parameter ist jedoch für die Qualität der Ergebnisse entscheidend. So ist bei der Analyse einer großen Anzahl von Mikrosatelliten bei einer großen Anzahl von Proben unbedingt die Forderung nach möglichst wenigen Variablen schon im Versuchsaufbau zu stellen, um die sonst entstehende Anzahl allein von technischen Fehlerquellen möglichst klein zu halten (Raina A and Dogra TD 2002, Vondruskova J et al. 2007).

Die Aufbereitung der PCR-Produkte zur Gel-Elektrophorese war versuchsunabhängig durchführbar. Eine recht große und schlecht zu beeinflussende Variabilität wies die Gelelektrophorese an sich auf. Zwar wurden die Gele immer nach dem gleichen Rezept und mit den gleichen technischen Hilfsmitteln zubereitet, der Elektrophoreselauf war jedoch hinsichtlich der Laufzeiten nur bedingt zu beeinflussen. Hier scheinen Faktoren wie die Umgebungstemperatur, aber auch die jeweilige Mikrostruktur der Elektrophoresegele eine größere Rolle zu spielen. Anders ist es nicht erklärbar, dass Proben aus der gleichen PCR in zwei unterschiedlichen Elektrophoreseläufen unterschiedliche Laufzeiten und ein unterschiedliches

Trennungsverhalten der einzelnen Banden des jeweiligen Mikrosatelliten aufwiesen. Zwar waren die Unterschiede nicht so groß, dass eine Auswertung nicht möglich war (das „Banden-Muster“ bleibt erhalten). Die Notwendigkeit zur individuellen Anpassung der Laufzeit schränkte jedoch die zeitliche Planbarkeit der Versuche durchaus ein. Eine gewisse Standardisierung wurde dadurch erreicht, dass die in jeder einzelnen Probe mitlaufenden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, vordefinierte Laufstrecken im Gel zu absolvieren hatten, bis die Elektrophorese beendet wurde.

Eine weitere Variable bei der Mikrosatellitenanalyse bestand in der Visualisierung der PCR-Produkte. Trotz gleich gestalteter Markierung der Primer mit gamma-ATP, mussten unterschiedlich gute Ergebnisse dieser Markierung in Kauf genommen werden. Das machte eine individuelle Veränderung der Exposition der PCR-Produkte auf dem Röntgenfilm notwendig. Auch hier waren die Versuchsreihen nur bedingt planbar. Dass unterschiedlich aufgebaute DNA-Primer für die gleiche DNA-Region in unterschiedlichen PCR-Produkten münden können, wird vereinzelt beschrieben (Vondruskova J et al., 2007).

Die Analyse der Mikrosatellitenmuster auf den Röntgenfilmen war hinsichtlich der Längenveränderungen (Shifts) gut durchführbar. Problematischer gestaltete sich die Bewertung der LOH. Hier ist ein optischer Vergleich zwischen dem Mikrosatelliten der Serum-DNA mit dem der Lymphozyten-DNA (als „Normalmuster“) essentiell. Fallen bestimmte Banden des Musters aus, handelt es sich um einen LOH. Um dies beurteilen zu können ist es jedoch Voraussetzung, dass die übrigen Banden des Mikrosatelliten in beiden zu vergleichenden Proben den gleichen Schwärzungsgrad auf dem Röntgenfilm aufweisen. Dies war bei den Serumproben in der ersten Elektrophorese oft nicht der Fall. Daher war es dann notwendig, in einer zweiten Elektrophorese die auf das Gel geladenen Mengen so zu variieren, dass eine möglichst identische Schwärzung des Röntgenfilms zu erwarten war (Abbildung 6). Die unterschiedliche Schwärzungsintensität zwischen DNA-Proben aus Serum und Stuhl gegenüber der DNA aus Lymphozyten rührte vor allem von den unterschiedlichen DNA-Ausgangskonzentrationen im PCR-Ansatz her. Da allein mit Volumina gearbeitet wurde und keine Konzentrationsmessungen der Ausgangs-DNA erfolgten, waren die Konzentrationen nicht bekannt. Eine Messung der Ausgangskonzentrationen der DNA bei den Serumproben war technisch in unserem Labor nicht durchführbar, weil zum einen die Konzentrationen der DNA im Serum zu gering sind und zum

anderen die Volumina der verfügbaren Ausgangsmaterialien zu klein waren, um noch solche zusätzlichen Versuche durchführen zu können.

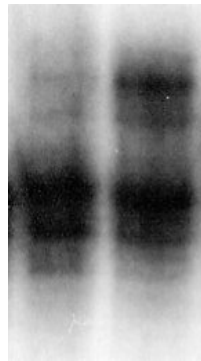


Abbildung 6: LOH (Patient 44). Die oberen Banden der Serum-DNA-Probe (links) sind im Vergleich zum Bandenmuster der Lymphozyten-DNA kaum noch zu erkennen.

Bei der Analyse der Stuhlproben wurde, wie oben beschrieben, ein anderer Weg gegangen. Hier war inzwischen über die Real-time-PCR eine DNA-Konzentrationsmessung auch mit vertretbarem DNA-Einsatz möglich. Durch Verdünnung der Ausgangs-DNA wurden nun in den Mikrosatelliten-PCR sehr ähnliche DNA-Konzentrationen von in diesem Falle Stuhl- und Lymphozyten-DNA eingesetzt. Das Ergebnis waren auch vergleichbare Konzentrationen an PCR-Produkten, die sich in einer ähnlichen Schwärzungsintensität auf den Röntgenfilmen niederschlugen. Eine notwendige Anpassung der Lademenge in der Elektrophorese zur Analyse von LOH war hierdurch viel seltener der Fall.

Auch bei technisch gelungener Darstellung der radioaktiv markierten Mikrosatelliten auf dem Röntgenfilm hat die manuelle Auswertung zwei entscheidende Nachteile. Die Auswertung bleibt recht subjektiv, weil allein das Auge des Betrachters über das Ergebnis entscheidet. Einen „Messwert“ gibt es nicht. Die Visualisierung der Ergebnisse von Untersuchungen ist eingeschränkt, weil die Röntgenfilme nur mit Einschränkungen der Bildqualität abfotografiert oder gescannt werden können. Eine Lösung für beide Probleme könnte die Umstellung des Analyseverfahrens auf eine Fluoreszenzmarkierung bieten. Mit der entsprechenden Technik ist es hier möglich, die Intensität des Fluoreszenzsignals direkt auf dem Elektrophoresegel zu

messen und das Ergebnis als Messwert und in graphischer Form darzustellen. Die Technik ist in anderen Labors etabliert und bietet zusätzlich den Vorteil, dass die recht aufwändigen Sicherheitsvorkehrungen hinsichtlich des Umgangs mit radioaktiven Substanzen entfallen. Dass sich hier die Methodik im Wandel befindet, zeigen die jüngeren Studien (Morifuji M et al., 2003, Schwarzenbach H et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich der Mikrosatellitenanalysen feststellen, dass wir mit einer ausreichend standardisierten Methode arbeiten konnten. Weiterentwicklungen wären jedoch aus den genannten Gründen sinnvoll.

4.3. Mikrosatellitenanalysen bei Patienten mit Colitis ulcerosa

Es stellt sich die Frage, warum in der vorliegenden Arbeit gerade auf die Gruppe der Patienten mit Colitis ulcerosa zurückgegriffen wurde. Dafür können folgende Gründe angegeben werden:

1. Es handelt sich um eine relativ seltene Erkrankung. Die Verfügbarkeit der Patienten ist jedoch durch deren Konzentration in einem klinischen Zentrum (Spezialsprechstunden) gut.
2. Für die Tumorforschung ergibt sich ein entscheidender Vorteil für mögliche Langzeitstudien. Die Diagnose der Erkrankung wird inzwischen in Deutschland meistens rasch gestellt. Damit kennt man mit einem großen zeitlichen Vorlauf eine Gruppe von Patienten, die ein erhöhtes Risiko für eine Tumorentstehung aufweisen. Prospektive Studien zur Tumorfrüherkennung werden so erst möglich.
3. Ein Nachteil der Kolitis-assoziierten Kolontumoren ist sicherlich die geringe Inzidenz. In Unicenter-Studien dürften so kaum statistisch verwertbare Ergebnisse zu erzielen sein. Vielmehr sind die gewonnenen Erkenntnisse – wie auch in der vorliegenden Arbeit - rein deskriptiver Natur.

Grundsätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die standardisierte Analyse einer definierten Auswahl an Mikrosatelliten möglich ist. Die Besonderheit dieser Arbeit liegt im Nachweis von Mikrosatellitenalterationen an frei zirkulierender Serum-DNA und zellfreier Stuhl-DNA bei der speziellen Risikogruppe der Patienten mit Colitis ulcerosa. Bisher wurden für diese spezielle Fragestellung nach unserem Wissen keine Ergebnisse außer den eigenen publiziert (Rauh P et al., 2003).

Dass die gefundenen Mikrosatellitenalterationen etwas mit der vorhandenen Erkrankung zu tun haben, wird durch das vollständige Fehlen von Alterationen in der Kontrollgruppe gestützt. Auch wenn statistische Auswertungen wegen der geringen Fallzahlen nicht sinnvoll scheinen, fällt doch auf, dass die Alterationen in Mikrosatelliten nachgewiesen wurden, die bei Analysen von sporadischen kolorektalen Karzinomen zwar untersucht sind, hier jedoch kaum verändert waren. Umgekehrt finden sich bei den Mikrosatellitenmarkern, die beim sporadischen kolorektalen Karzinom in hoher Frequenz verändert sind, und die deshalb zur Klassifikation dieser Tumoren in mikrosatellitenstabile und -instabile Tumoren Verwendung finden, keine Veränderungen in unserem Patientengut. Natürlich kann das auf Zufall beruhen. Eine andere Erklärung wäre aber im Zusammenhang mit der in Publikationen beschriebenen veränderten Wachstumsform und Lokalisation der Tumoren bei Patienten mit Colitis ulcerosa gegenüber denen aus der Gruppe der Patienten mit einem sporadischen kolorektalen Karzinom zu suchen (Riddel RH et al., 1983). Möglicherweise spiegelt die Veränderung anderer Mikrosatelliten eine andere Tumorbiologie wider, die sich dann in einer abweichenden Morphologie ausdrückt.

Mehrere Aspekte wären für die Verwendung von Mikrosatellitenanalysen aus zellfreier DNA hinsichtlich der Tumor-Früherkennung und Verlaufskontrolle bei Patienten mit Colitis ulcerosa klinisch interessant. Voraussetzung ist jedoch ein etabliertes, klinisch validiertes Panel an Mikrosatellitenmarkern und gerade dies stellt die größte Schwierigkeit und Herausforderung dar. Während ein sich entwickelnder Tumor erst nach Jahren makroskopisch zu entdecken ist, scheinen Mikrosatellitenanalysen viel früher genetische und tumorassoziierte Veränderungen zu detektieren. Ein Problem stellt in diesen Fällen jedoch das Finden der Lokalisation des Tumor dar, was aber in der klinischen Praxis Voraussetzung für eine Therapieentscheidung ist. Es ist auch wenig darüber bekannt, wie klinisch relevant überhaupt das Wissen um das Vorhandensein genetisch alterierter Zellen ist, wenn sich noch kein Tumor im makroskopischen Sinne zeigt. Die Frage hier ist also, ob sich bei jedem Nachweis einer genetischen Alteration auch in der Folge ein Tumor entwickelt.

Eine Konsequenz des Wissen um vorhandene genetische Alterationen beim einzelnen Patienten könnte bei nachgewiesener Relevanz für den Patienten eine Risikostratifizierung sein. Z.B. mit dem Ergebnis, Patienten mit Alterationen in kürzeren Abständen Kontroll-Koloskopien zu unterziehen oder speziellere aber auch zeitlich aufwändigere Diagnoseverfahren, wie z.B. die Chromoendoskopie zur Detektion von Mukosaarealen mit dysplastischen Zellen oder

Tumorfrühstadien, anzuwenden. Die Durchführung von Mikrosatellitenanalysen speziell an frei zirkulierender DNA aus Serum oder an zellfreier DNA aus Stuhl wäre deshalb in der Praxis interessant, weil diese Materialien einfach und ohne größere Belastungen und Risiken für den Patienten zu gewinnen wären.

Dass in der DNA aus Stuhl und aus dem Serum in unseren Versuchen unterschiedliche Alterationen gefunden wurden, mag zunächst verwundern und auch als Argument gegen eine Analyse von DNA aus diesen Materialien sprechen. Bei Betrachtung der Literatur findet sich jedoch dieses Problem an vielen Stellen. So gehen verschiedene Publikationen auf die fehlende Übereinstimmung von Mikrosatellitenalterationen bei DNA direkt aus Tumoren und zusätzlich analysierter zellfreier DNA aus unterschiedlichen Körperflüssigkeiten oder dem Stuhl ein. Mittlerweile scheint hier ein Konsens darüber zu bestehen, dass einer der Hauptgründe für diese Beobachtung die große genetische Heterogenität eines Tumor darstellt (Tada M et al., 1993; Kopreski MS et al., 2000; Tortola S et al., 2001). Unterschiedliche Zellverbände in einem Tumor sind offenbar in unterschiedlichem Maße in der Lage, Anschluss an das Blutgefäßsystem zu finden und DNA in den Körper freizusetzen (Kölble K et al., 1999). Wie einige Arbeiten zeigen, handelt es sich bei dieser Freisetzung um einen aktiven Prozess (Rogers JC et al., 1972; Stroun M et al., 2001). Mit diesem Wissen als Hintergrund erklären sich Unterschiede zwischen Mikrosatelliten-Analysen aus zellfreier Stuhl-DNA und frei zirkulierender Serum-DNA dann recht zwanglos. Konsequenz für einen möglichen Einsatz in der klinischen Diagnostik wäre, die einzelnen Kompartimente, aus denen zellfreie DNA gewonnen wird, hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität getrennt zu analysieren.

Solange nicht Mikrosatellitenalterationen oder andere Tumormarker auf DNA-Ebene definiert sind, die einen sicheren Zusammenhang zu einem (klinisch relevanten) Tumor haben, wird die große genetische Heterogenität von Tumoren das limitierende Problem bei der praktischen Anwendung von Mikrosatellitenanalysen in der (Tumor)diagnostik bleiben.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Pilotstudie hatte das Ziel, Methoden zur Analyse von Mikrosatelliten aus DNA in Serum und Stuhl von Patienten mit Colitis ulcerosa zu etablieren und zu standardisieren. Hierbei war entscheidend, dass eine größere Anzahl von Mikrosatelliten an einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden kann. Auch die Grenzen der einzelnen Verfahren sollten beleuchtet und Ansätze für die qualitative Weiterentwicklung der Methoden gefunden werden.

Die Ergebnisse kann man wie folgt zusammenfassen:

- Es wurden Methoden zur Isolation von DNA aus Serum und Stuhl etabliert. Hierbei wurde aus Gründen einer möglichst großen Standardisierbarkeit auf etablierte industrielle Kits zurückgegriffen. Durch Modifikationen konnte eine sichere Gewinnung von DNA zur molekularbiologischen Analyse gewährleistet werden. Probleme finden sich noch bei der Quantifizierbarkeit der Serum-DNA.
- Für die Analyse der Mikrosatelliten konnte ein Protokoll entwickelt werden, das unabhängig von der verwendeten Ausgangs-DNA ist. Nur wenige Modifikationen sind bei den PCR notwendig, so dass auch eine große Probenzahl hinsichtlich mehrerer Mikrosatelliten untersucht werden kann. Es existieren Nachteile in der Visualisierung der Mikrosatelliten, die durch die Umstellung von einer radioaktiven Markierung auf eine fluoreszenzbasierte Detektionsmethode behoben werden könnten.
- Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa konnten Mikrosatellitenalterationen sowohl in Serum- als auch in Stuhl-DNA nachgewiesen werden. Wir fanden keinen Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und den Alterationen sowie zwischen Alterationen in Serum- und Stuhl-DNA. Statistische Aussagen sind jedoch bei der begrenzten Anzahl der Patienten und vor allem wegen der geringen Zahl der gefunden Mikrosatellitenalterationen nicht sinnvoll möglich.

6. Literaturverzeichnis

Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18: 65-73.

Bergallo M, Costa C, Gribaudo G, Tarallo S, et al. Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiol* 2006;29:111-9.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-57.

Bonanno E, Rulli F, Galatà G, Pucci S, Sesti F, Farinon AM, Spagnoli LG. Stool test for colorectal cancer screening: what is going on? *Surg Oncol*. 2007 Dec;16 Suppl 1:S43-5.

Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP, et al. Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 1996;56:1237-40.

Bruhn N, Beinert T, Oehm C, et al. Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000;906:72-82.

Chang CL, Wang SY, Wu CC, et al. Microsatellite alterations in exfoliated cervical epithelia deoxyribonucleic acid as a marker for high-grade dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:108-15.

Chang YC, Ho CL, Chen HH, et al. Molecular diagnosis of primary liver cancer by microsatellite DNA analysis in the serum. *Br J Cancer* 2002;87:1449-53.

Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, et al. Related Articles, Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996;2:1033-5.

Choi PM, Nugent FW, Schoetz DJ, Jr., et al. Colonoscopic surveillance reduces mortality from colorectal cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1993;105:418-24.

Connell WR, Talbot IC, Harpaz N, et al. Clinicopathological characteristics of colorectal carcinoma complicating ulcerative colitis. *Gut* 1994; 35: 1419-23.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48:526-35.

Diaz-Cano SJ. Are PCR artifacts in microdissected samples preventable. *Hum Pathol* 2001; 32:1415-6.

Ezaki T, Watanabe M, Inoue N, et al. A specific genetic alteration on chromosome 6 in ulcerative colitis-associated colorectal cancers. *Cancer Res* 2003;63:3747-9.

Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-a survey. *Biochem Biophys Acta* 2007;1775:181-232.

Flekna G, Schneeweiss W, Smulders FJ, Wagner M, Hein I. Real time PCR method with statistical analysis to compare the potential of DNA isolation methods to remove PCR inhibitors from samples for diagnostic PCR. *Mol Cell Probes* 2007;21:282-7.

Giardiello FM, Gurbuz AK, Bayless TM. Colorectal cancer in ulcerative colitis: effect of a cancer prevention strategy on survival. *Gastroenterology* 1993;104:A502.

Goessl C, Heicappell R, Munker R, et al. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:4728-32.

Herszenyi L, Miheller P, Tulassay Z. Carcinogenesis in inflammatory bowel disease. *Dig Dis*. 2007;25:267-9.

Hickey KP, Boyle KP, Jepps HM, Andrew AC, Buxton EJ, Burns PA. Molecular detection of tumour DNA in serum and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 1999;80:1803-8.

Hynn, JS, Jo BK, Park CJ, Yi JY, Lee JY, Rhyn MG. Loss of heterozygosity and PCR artifacts in a microsatellite analysis of psoriasis and colorectal cancer. *J Korean Med Sci* 2002;17:641-7.

Jablonska M. Management of cancer surveillance in ulcerative colitis. *Gut* 1995;37 Suppl.2:A90.

Jass JR. Colorectal cancer: a multipathway disease. *Crit Rev Oncog* 2006 Dec;12:273-87.

Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K et al. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007 Dec; 5:1424-9.

Karlen P, Kornfeld D, Brostrom O, et al. Is colonoscopic surveillance reducing colorectal cancer mortality in ulcerative colitis? A population based case control study. *Gut* 1998;42:711-4.

Klaassen CH, Jeunink MA, Prinsen CF, et al. Quantification of human DNA in feces as a diagnostic test for the presence of colorectal cancer. *Clin Chem* 2003;49:1185-7.

Kölble K, Ullrich OM, Pidde H, et al. Microsatellite alterations in serum DNA of patients with colorectal cancer. *Lab Invest* 1999;79:1145-50.

Kopreski MS, Benko FA, Borys DJ, et al. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:918-23.

Kornfeld D, Ekbohm A, Ihre T. Is there an excess risk for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis and concomitant primary sclerosing cholangitis? A population based study. *Gut* 1997;41:522-5

Kronborg O, Regula J. Population screening for colorectal cancer: advantages and drawbacks. *Dig Dis*. 2007;25:270-3.

Laing IA, Goldblatt J, Eber E, et al. A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma. *J Med Genet* 1998;35:463-7.

Leclercq S, Rivals E, Jarne P. Detecting microsatellites within genomes: Significant variation among algorithms. *BMC Bioinformatics* 2007;8:125.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646-50.

Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, et al. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol* 1977;4:139-43.

Li YC, Korol AB, Fahima T, et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 2002;11:2453-65.

Lim SB, Jeong SY, Kim IJ, et al. Analysis of microsatellite instability in stool DNA of patients with colorectal cancer using denaturing high performance liquid chromatography. *World J Gastroenterol*. 2006 Nov 7;12:6689-92.

Lininger RA, Park WS, Man YG, et al. LOH at 16p13 is a novel chromosomal alteration detected in benign and malignant microdissected papillary neoplasms of the breast. *Hum Pathol* 1998;29:1113-8.

Mandel und Métais. Les Acides Nucleiques Du Plasma Sanguin Chez L'Homme. *CR Acad Sci Paris* 1948; 142: 241-243.

Morfuji M, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Sueda T, Yokoyama T. Fluorescent-based BAT-26 analysis for distinct screening of microsatellite instability in colorectal cancers. *Int J Oncol* 2003;22:807-13.

Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996;2:1035-7.

Oda S, Oki E, Maehara Y, Sugimachi K. Precise assessment of microsatellite instability using high resolution fluorescent microsatellite analysis. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3415-20.

Olejuiczak M, Krzyzosiak WJ. Genotyping of simple sequence repeats – factors implicated in shadow band generation revisited. *Electrophoresis* 2006; 27: 3724-34.

Osborn NK, Ahlquist DA. Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches. *Gastroenterology*. 2005 Jan;128:192-206.

Park WS, Pham T, Wang C, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in non-neoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Int J Mol Med* 1998;2:221-224.

Perini GI, Menegazzo E, Ermani M, et al. Cognitive impairment and (CTG)_n expansion in myotonic dystrophy patients. *Biol Psychiatry* 1999;46:425-31.

Podolsky DK. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-29.

Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic Inflammatory Bowel Disease and Cancer. *Hepato-Gastroenterology* 2000;47:57-70

Raina A, Dogra TD. Application of DNA fingerprinting in medicolegal practice. *J Indian Med Assoc* 2002;100:688-94.

Rauh P, Rickes S, Fleischhacker M. Microsatellite alterations in free-circulating serum DNA in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis* 2003;21:363-6.

Riddel RH, Goldman H, Ransohoff DF, et al. Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease: Standardized Classification with Provisional Clinical Applications. *Human Pathology* 1983;14: 931-68.

Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, Skinner A, Valeri CR. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:1685-9.

Rohland N, Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques* 2007;42:343-52.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molekular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989;6. Auflage.

Schlechte HH, Schnorr D, Löning T, et al. Mutation of the tumor suppressor gene p53 in human prostate and bladder cancers—investigation by temperature gradient gel electrophoresis. *J Urol* 1997;157:1049-53

Schmidt B, Weickmann S, Witt C et al. Improved method for isolating cell-free DNA. *Clin Chem* 2005 Aug;51:1561-3.

Schmiegel W, Adler G, Fruhmorgen P, et al. Colorectal carcinoma: prevention and early detection in an asymptomatic population—prevention in patients at risk—endoscopic diagnosis, therapy and after-care of polyps and carcinomas. German Society of Digestive and Metabolic Diseases/Study Group for Gastrointestinal Oncology. *Z Gastroenterol* 2000;38:49-75.

Schwarzenbach H, Muller V, Beeger C, Gottberg M, Stahmann N, Pantel K. A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007;9:R66.

Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983;51:2116-20.

Shaw JA, Smith BM, Walsh T, et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:1119-24.

Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, et al. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest* 1999;116:47-51.

Sieben NL, ter Haar NT, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, Cleton-Jansen AM. PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells. *Hum Pathol* 2000;31:1414-9.

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Mulcahy HE, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001;313:139-42.

Suzuki H, Harpaz N, Tarmin L, et al. Microsatellite instability in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasias and cancers. *Cancer Res* 1994;54:4841-4.

Tada M, Omata M, Kawai S, et al. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993;53:2472-4.

Terdiman JP, Aust DE, Chang CG, Willenbacher RF, Baretton GB, Waldman FM. High resolution analysis of chromosome 18 alterations in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;136:129-37.

Tortola S, Steinert R, Hantschick M, et al. Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:2837-43.

Traverso G, Shuber A, Olsson L, et al. Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet* 2002;359:403-4.

Tsopanomichalou M, Kouroumalis E, Ergazaki M, Spandidos DA. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in human non-neoplastic hepatic lesions. *Liver* 1999;19:305-11.

Utting M, Werner W, Dahse R, Schubert J, Junker K. Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:35-40.

Vondruskova J, Parizkova N, Kypr J. Factors influencing DNA expansion in course of polymerase chain reaction. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2007;26:65-82.

Weber JL. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Curr Opin Biotechnol* 1990;1:166-71.

Whitney D, Skoletsky J, Moore K, et al. Enhanced retrieval of DNA from human fecal samples results in improved performance of colorectal cancer screening test. *J Mol Diagn* 2004;6:386-95.

Woerner SM, Kloor M, von Knebel Doeberitz M, et al. Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient tumors. *Cancer Biomark* 2006;2:69-86.

Wooster R, Cleton-Jansen AM, Collins N, et al. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet* 1994;6:152-6.

Young GP, Cole S. New stool screening tests for colorectal cancer. *Digestion* 2007;76:26-33.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AE	DNA-Elutionspuffer der Fa. Qiagen
AW	Waschpuffer der Fa. Qiagen
ASL	Stuhllysepuffer der Fa. Qiagen
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaar(e)
C	Zytosin
ca.	zirka
CrP	C-reaktives Protein
DEPC+	Diethyl-Pyrocbonat
DNA	Desoxiribinucleinsäure
23P	Phosphor 23, Isotop von Phosphor
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
et al.	et altera
etc.	etcetera
Fa.	Firma
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
γ ATP	radioaktiv markiertes Adenosintriphosphat
h	Stunde(n)
krpm	kilo rounds per minute (Drehzahl der Zentrifuge)
LOH	Verlust der Heterozygotie oder Lost of Heterozygosity
NaCl	Natriumchlorid
M	Mol pro Liter
min	Minute(n)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonucleinsäure
T	Thymin
TaqGold Polymerase	Enzym: spezielle <i>Thermophilus aquaticus</i> Polymerase

Tris	Trimethamin-Puffer
T4-Kinase	Enzym: T4 Polynukleotidkinase
U	Unite
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8. Danksagung

Mein Dank für die unermüdliche und geduldige Unterstützung während der gesamten Forschungsphase und beim Erstellen der Dissertationsschrift gilt zunächst Herrn Dr. rer. nat. Michael Fleischhacker und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. Steffen Rickes.

Herrn Prof. Dr. med. Herbert Lochs und Herrn Prof. Dr. med. Kurt Possinger danke ich für die Möglichkeit, die Arbeiten innerhalb ihrer Kliniken durchführen zu können.

Meiner Familie danke ich für die Geduld und die manchmal notwendigen motivierenden Gespräche.

9. Erklärung

„Ich, Peter Rauh, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Mikrosatellitenanalysen an zellfreier DNA bei Patienten mit Colitis ulcerosa“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.