

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt

Klinikum der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler

**Nachweis disseminierter Tumorzellen operabler gastrointestinaler Tumoren
mittels quantitativer RT-PCR von Melanom Antigen (MAGE) - A - Transkripten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Matthias Nischwitz

aus

Bobingen

Jahr

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Hallfeldt

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. F. T. Kolligs
Prof. Dr. R. Issels

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. S. Schmidbauer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2007

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
1. Einleitung	5
1.1 Klinischer Hintergrund	5
1.2 Tumorentstehung und Metastasierungsverhalten	6
1.2.1 Entstehung des Primärtumors	6
1.2.2 Metastasierungsverhalten	7
1.2.3 Definition disseminierter Tumorzellen.....	9
1.3 Nachweis disseminierter Tumorzellen bei gastrointestinalen Tumoren	10
1.3.1 Immunhistochemische Verfahren	11
1.3.2 Nachweisverfahren auf DNA-Ebene	12
1.3.3 Nachweisverfahren auf mRNA-Ebene am Beispiel der RT-PCR	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut	17
2.2 Zelllysisierung und Kryokonservierung des Lysats	20
2.3 RNA-Isolierung mit RNeasy® Mini Kit	21
2.4 cDNA-Synthese	25
2.5 Quantitative RT-PCR	27
2.6 Zellverdünnungs-Experimente und Herstellung von Positivkontrollen	34
2.6.1 Kultivierung von HT 29 Zellen	34
2.6.2 Zellverdünnungs-Experimente und Positivkontrollen	36
2.7 Statistische Methoden	37
2.8 Patienteneinverständnis und Ethikvotum	38

3.	Ergebnisse	39
3.1	Quantitative RT-PCR	39
3.2	Klinische Parameter	45
3.2.1	Gesamtstatistik	45
3.2.2	Abhängigkeit der Disseminierung von der Tumorausdehnung (pT-Stadium)	50
3.2.3	Abhängigkeit der Disseminierung von der Lymphknotenbeteiligung (pN-Stadium)	51
3.2.4	Abhängigkeit der Disseminierung von Fernmetastasen (M-Stadium)...	52
3.2.5	Abhängigkeit der Disseminierung vom Grading (G-Stadium).....	53
3.2.6	Abhängigkeit der Disseminierung vom Tumortyp	55
3.2.7	Abhängigkeit der Disseminierung vom Alter der Patienten	56
3.2.8	Abhängigkeit der Disseminierung vom Geschlecht	57
3.2.9	Abhängigkeit der Disseminierung vom Abnahmezeitpunkt der zentralvenösen Vollblutproben (präoperativ/postoperativ)	60
4.	Diskussion	62
4.1	Methodendiskussion	62
4.2	Diskussion der klinischen Daten	67
	 Literaturverzeichnis	 71
	Danksagung	76
	Erklärung	78
	Lebenslauf	79

Zusammenfassung

Bei Patienten mit malignen gastrointestinalen Tumoren kommt es auch nach erfolgter R0-Resektion des Primärtumors häufig in der Folgezeit noch zur Ausbildung von Fernmetastasen. Ursächlich hierfür sind disseminierte Tumorzellen, die sich bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorentstehung vom Primärtumor absiedeln, anschließend jedoch in eine Art Ruhephase als „dormant cells“ fallen und erst zu einem späteren Zeitpunkt wieder in die Proliferationsphase eintreten. Hinsichtlich der Evaluation des Rezidivrisikos stellen diese disseminierten Zellen zwar einen unabhängigen Prognosefaktor dar, sind jedoch im Einzelfall mit bisher zur Verfügung stehenden Nachweismethoden nur unzureichend zu identifizieren. In dieser Arbeit haben wir uns zum Ziel gesetzt, ein diagnostisches Verfahren zu entwickeln, das es uns einerseits erlaubt, disseminierte Tumorzellen mit hoher Sensitivität und Spezifität zu charakterisieren und quantifizieren, andererseits dem Patienten eine permanente Verlaufskontrolle durch einen einfachen Zugang zu ermöglichen.

Hierfür entwickelten wir eine quantitative Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), die hinsichtlich der Zielstruktur auf die außerordentlich spezifische Familie der Melanom-Antigen-Gene (MAGE)-A ausgerichtet war. Die Expression dieser Antigene konnte bisher in vielen verschiedenen Tumortypen nachgewiesen werden, nicht jedoch in nicht-tumorösen, adulten Geweben mit Ausnahme des Hodens. Eine hohe Sensitivität der Methode war durch die Identifikation einer Consensus-Sequenz der MAGE-A-Gene gewährleistet, wodurch wir in der Lage waren, unsere Primer so zu konstruieren, dass in einem Ansatz die MAGE-Subtypen A1-A6 gleichzeitig nachgewiesen werden konnten. Zum einen führten wir damit Zellverdünnungs-Experimente mit der Kolonkarzinom-Zelllinie HT 29 durch, bei denen jeweils 10 ml zentralvenöses Vollblut mit einer unterschiedlichen Anzahl HT 29-Zellen versetzt wurden. Ebenfalls wurden zur Kontrolle 14 Vollblutproben von Patienten ohne Tumorerkrankung aufgearbeitet. Zum anderen untersuchten wir 22 zentralvenöse prä- und postoperative Vollblutproben von Patienten mit operablen gastrointestinalen Tumoren und 19 intraoperativ gewonnene Peritoneallavagen auf das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen.

Zusammenfassung

Die Zellverdünnungs-Experimente erbrachten das Ergebnis, dass mit dem verwendeten Analyseverfahren das Vorhandensein von fünf einzelnen Tumorzellen in zehn Millilitern zentralvenösen Vollblutes nachgewiesen werden kann. Dies entspricht einer Empfindlichkeit des Nachweises von einer malignen Zelle in 10^7 bis 10^8 mononukleären Zellen. Alle 14 untersuchten Negativkontrollen wurden korrekt als MAGE-A-negativ identifiziert. Von den 22 Vollblutproben der Tumorpatienten konnte präoperativ bei 10 (= 45,5%), postoperativ bei 13 (= 59,1%) eine Disseminierung nachgewiesen werden. Fünf der 19 analysierten Peritoneallavagen erbrachten ein MAGE-A-positives Ergebnis. Dabei zeigte sich keinerlei Abhängigkeit der Disseminierung von der Tumorausdehnung (pT), der Lymphknotenbeteiligung (pN), Fernmetastasen (M), Grading (G), Tumortyp, Alter oder Geschlecht der Patienten.

Ob und in welcher Art und Weise die Expression von MAGE-Genen möglicherweise Zellen überhaupt erst dazu befähigt, sich vom Primärtumor abzusiedeln und welchen Einfluss die Operation selbst am Auftreten einer Disseminierung maligner Zellen hat, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend untersucht und sollte Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

Hierfür haben wir ein hochsensitives und –spezifisches Verfahren zum Nachweis disseminierter Tumorzellen entwickelt, auf dessen Grundlage es gelingen könnte, geeignete Patienten spezifischen adjuvanten Immuntherapiekonzepten mit MAGE als Zielstruktur zuzuführen und so das späte Auftreten von Metastasen zu verhindern.

1. Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Trotz jahrzehntelanger Forschung und des fortschreitenden Auftretens neuer vielversprechender Therapien stellen gastrointestinale Tumoren eine der Hauptmorbiditäts- und -mortalitätsursachen unserer Gesellschaft dar [3]. Weltweit mehrere Millionen Tote pro Jahr durch gastrointestinale Tumoren [46] zeigen die Dringlichkeit der Entwicklung verbesserter Diagnostik- und Therapieverfahren.

In der Regel erweist sich die chirurgische Therapie als die beste Therapieoption, solange der Tumor ein lokalisiertes Stadium aufweist. Bezüglich einer kompletten Heilung ergeben sich für den einzelnen Patienten zwei wesentliche Fragestellungen: einerseits, ob die Entfernung des Tumors komplett (R0) vorgenommen werden konnte, und andererseits, ob bereits frühzeitig eine okkulte Disseminierung von Tumorzellen auf hämatogenem oder lymphatischem Weg stattgefunden hat [31]. Die Neigung der diversen Tumorentitäten zur frühzeitigen Disseminierung scheint ähnlich ausgeprägt zu sein und bestimmt zum heutigen Zeitpunkt zunehmend die Letalitätsrate von Krebspatienten [43, 41, 56].

Leider erlauben heute gebräuchliche Tumor-Staging-Parameter (wie z.B. TNM-Klassifikation) lediglich eine statistische und damit relativ unpräzise Abschätzung des Rezidivrisikos, jedoch ist es nicht möglich, eine für den Patienten spezifische individuelle Prognose zu erstellen oder eine Entscheidung über die Frage zu treffen, ob eine systemische adjuvante Therapie nach chirurgischer Resektion des Primärtumors zur Sekundärprävention eines metastatischen Rezidivs beim einzelnen Patienten eingesetzt wird. Dem direkten Nachweis einer minimalen residualen Krebserkrankung kommt daher ein besonders hoher Stellenwert zu [43]. Hochauflösende bildgebende Verfahren (wie z.B. MRT oder Spiral-Computertomographie) sind jedoch maximal in der Lage, Strukturen von 3-5 mm Durchmesser darzustellen, was einem Zellverband von rund 10^8 Zellen entspricht und somit bei Weitem unzureichend ist [49, 23].

Einleitung

Diverse Studien haben gezeigt, dass einzelne disseminierte Tumorzellen einen unabhängigen Prognosefaktor bezüglich des Rezidivrisikos darstellen [5]. Bestrebungen der Erfassung von sowohl isolierten Tumorzellen als auch von Mikrometastasen in einer erweiterten Form der pTNM-Klassifikation im Rahmen des UICC-Stagings [22] unterstreichen Relevanz und Dringlichkeit, ein diagnostisches Verfahren zu entwickeln, das es einerseits erlaubt, disseminierte Tumorzellen zu charakterisieren und zu quantifizieren, andererseits eine permanente Verlaufskontrolle durch einen einfachen Zugang zu ermöglichen, um eine individuelle Prognose und eventuelle Ziele adjuvanter Therapiestrategien an den jeweiligen Patienten anpassen zu können [5].

1.2 Tumorentstehung und Metastasierungsverhalten

1.2.1 Entstehung des Primärtumors

Beim Prozess der Entstehung von gastrointestinalen Tumoren handelt es sich um einen in vielen Schritten ablaufenden Vorgang, der bis heute nur zum Teil verstanden und aufgeklärt ist. Grundsätzlich erleiden einzelne Zellen wiederholt Schäden auf der Ebene der DNA, was letztendlich in einem Zustand genomischer Instabilität endet und nicht mehr korrigiert bzw. kompensiert werden kann. Krebszellen weisen folglich zum einen an der Stelle des Primärtumors Unterschiede gegenüber benachbarter Gewebszellen auf, zum anderen können sich im Blut befindende Tumorzellen von reifen und unreifen Zellen des hämatopoetischen Systems klar abgegrenzt werden [31]. Es entstehen also durch klonale Selektion komplett unterschiedliche Zellpopulationen [30] mit unterschiedlichen invasiven Eigenschaften und unterschiedlichem Metastasierungspotential [14]. Bei einigen Zellklonen führen dann diese Änderungen im Expressionsmuster zu aggressiverem Wachstumsverhalten und der Fähigkeit, sich der Überwachung des Immunsystems entziehen zu können; gleichzeitig bleiben jedoch Gene, die für die vitalen Funktionen der Zelle verantwortlich sind (z.B. Enzyme oder Strukturproteine), unverändert [31]. Am Ende schließlich stehen Gruppen von Zellen, die gegenüber anderen Populationen einen deutlichen

Einleitung

Selektionsvorteil aufweisen, indem sie länger überleben und sich häufiger teilen können [57], und somit zum klinischen Bild eines soliden malignen Tumors führen.

1.2.2 Metastasierungsverhalten

Die Fähigkeit zur Absiedlung von Tochterzellen stellt zusammen mit der Invasivität eines der wesentlichen Charakteristika bei der Abgrenzung maligner Tumoren gegenüber benignen Neoplasien dar. Essentielle Voraussetzung ist die Invasion der extrazellulären Matrix. Von dort aus dringen die Zellen in Lymph- oder Blutgefäße ein und werden durch den Fluss in ihnen zu anderen Organen transportiert, bis sie dort im Kapillarbett größenbedingt aufgehalten und (blutdruckabhängig) auch deformiert werden (siehe Abbildung 2a [10]). Die Zellen sind über Adhäsionsprozesse auch in der Lage, die Zirkulation wieder zu verlassen. An neuer Stelle können sich nun durch lokale Proliferation und gleichzeitige Neovaskularisation und Angiogenese Metastasen bilden. Abbildung 1 [13] fasst diesen Prozess zusammen.

Einleitung

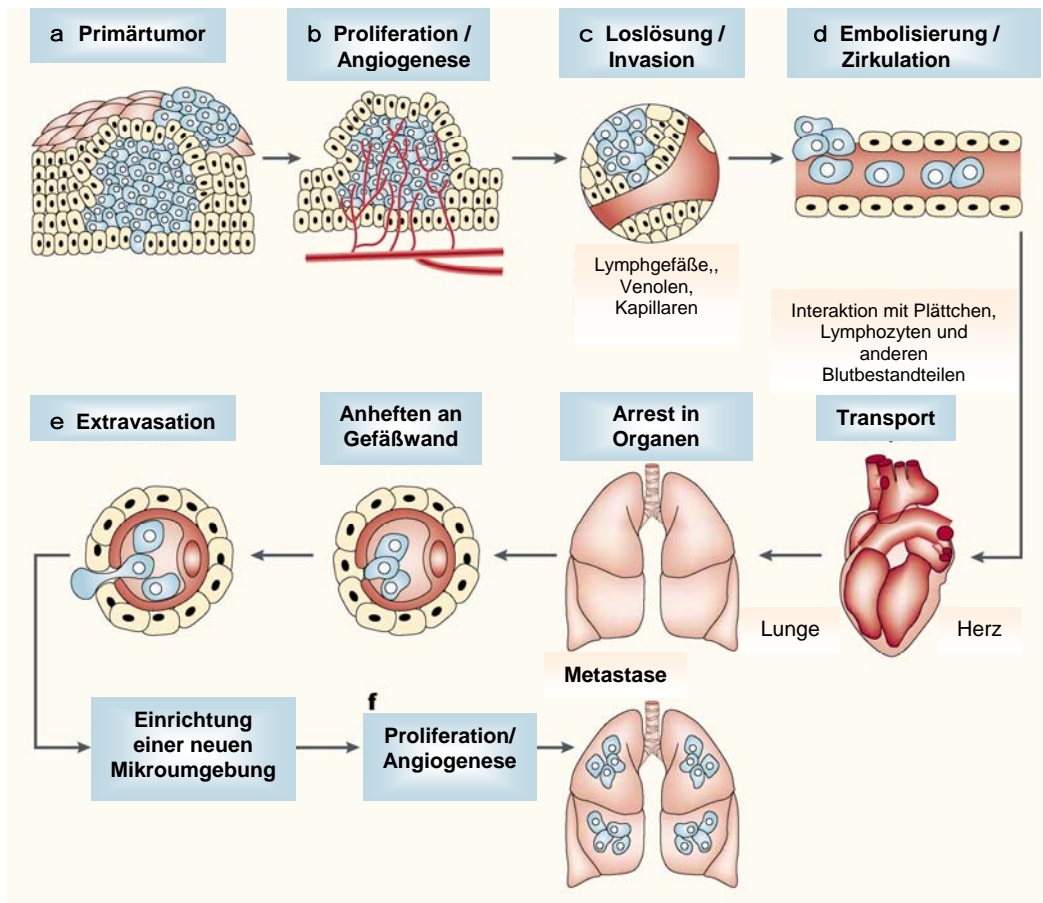


Abbildung 1: Die einzelnen Schritte bei der Formation von Metastasen (nach [13])

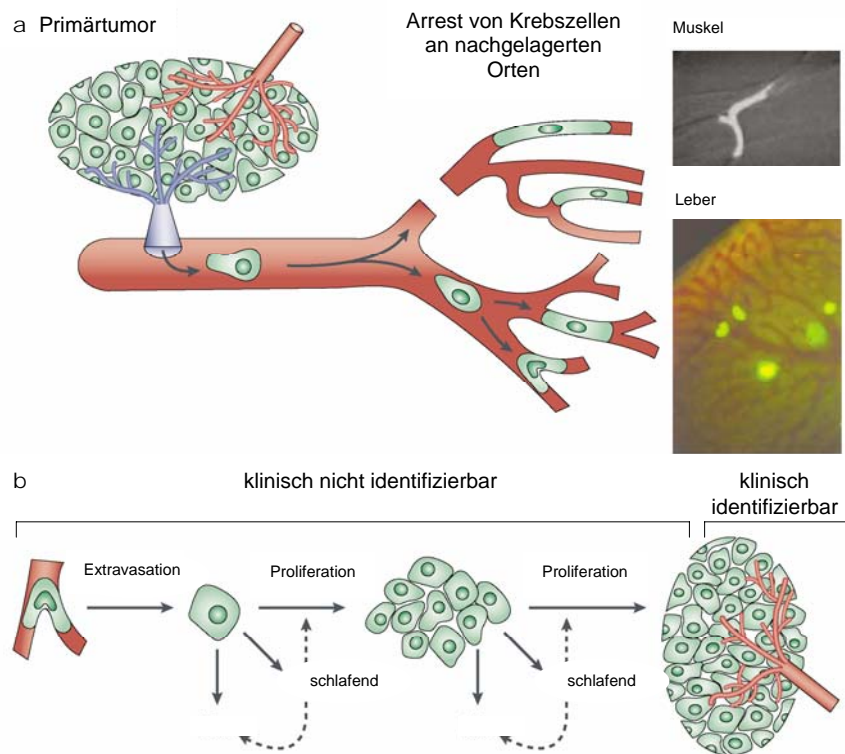


Abbildung 2a: Arrest der Tumorzellen im Kapillarbett (nach [10])

Abbildung 2b: Mögliche Wege von disseminierten Tumorzellen nach der Loslösung vom Primärtumor (nach [10])

Einleitung

Allerdings stellt die Formierung einer Metastase einen sehr komplexen Prozess dar, bei dem nur ein extrem geringer Teil aller zirkulierenden Tumorzellen überlebt und im weiteren Verlauf eine Metastase begründen kann [21]. Ebenso können die Zellen in eine Art Ruhephase eintreten und als sogenannte „schlafende Zellen“ (dormant cells) bestehen bleiben, um zu einem späteren Zeitpunkt erneut in eine Proliferationsphase einzutreten oder auch zugrunde zu gehen. Auch nach der Absiedlung vom Primärtumor ereignen sich weitere Alterationen auf genomischer Ebene, so dass sowohl Unterschiede zwischen Primärtumor und Tochterzellen als auch zwischen den abgegebenen Tochterzellen untereinander festzustellen sind [2, 38, 39, 61]. Abbildung 2b [10] beschreibt die unterschiedlichen Wege einer Tumorzelle, die sich vom Primärtumor abgesiedelt hat.

1.2.3 Definition disseminierter Tumorzellen

Beim Studium der einschlägigen Literatur fallen immer wieder Ungenauigkeiten auf dem Feld der Terminologie disseminierter Tumorzellen in Blut- oder Lymphgefäßen auf. Einigkeit besteht zwar in der Tatsache, dass selbst kleine Tumoren bereits Disseminierung aufweisen [5], allerdings werden die Begriffe „Disseminierte Tumorzellen“ und „Mikrometastase“ fälschlicherweise synonym gebraucht. Insbesondere eine Arbeit von Paul Hermanek et al. [21] grenzt diese beiden Begriffe jedoch klar voneinander ab:

Von einer *Mikrometastase* kann erst gesprochen werden, nachdem Extravasation (d.h. Durchtritt durch das Gefäß oder den Lymphsinuswall), in aller Regel eine extravaskuläre Stromareaktion und schließlich eine extravaskuläre Tumorzell-Proliferation stattgefunden haben. Diese Zellaggregate besitzen definitionsgemäß eine maximale Ausdehnung von 0,2 cm und werden häufig auch mit dem Begriff „okkulte Metastasen“ bezeichnet. Folglich kann eine Mikrometastase nur auf dem Weg einer histologischen Untersuchung diagnostiziert werden.

Einleitung

Bei *disseminierten Tumorzellen* handelt es sich hingegen um einzelne Tumorzellen (oder nach Hermanek maximal um kleine Zellcluster), bei denen es zu keinerlei Extravasation, Stromareaktion oder extravaskulärer Zellproliferation gekommen ist. Synonym können die Begriffe „isolierte (ITC)“ oder „zirkulierende Tumorzellen“ gebraucht werden, auch Bezeichnungen wie „minimal residual cancer cells (MRCC)“ oder „minimal residual disease (MRD)“ sind hierfür möglich.

1.3 Nachweis disseminierter Tumorzellen bei gastrointestinalen Tumoren

Für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen eignet sich grundsätzlich eine Vielzahl biologischer Quellen, wie z.B. Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Urin, Stuhl, Organbiopsien oder Lavagen aus verschiedenen Organbereichen. Um aus diesen Materialien allerdings die gewünschten Informationen gewinnen zu können, sind in erster Linie zwei Voraussetzungen unabdingbar:

Zum einen bedarf es der Kenntnis hochspezifischer Tumormarker, die Personen ohne fragliche Erkrankung tatsächlich als Nichtkranke erkennen; zum anderen ist ebenso eine hohe Sensitivität der angewandten Nachweismethoden essentiell, um möglichst viele Personen mit einer fraglichen Erkrankung als Kranke zu identifizieren [5, 48].

Hier liegt bereits eine der wesentlichen Schwierigkeiten im Bereich der Diagnostik, da sich Sensitivität und Spezifität von Tests meist gegenläufig verhalten, d.h. je spezifischer ein Test ist, desto weniger sensitiv ist er, desto schlechter kann er also die tatsächlich Kranken erkennen und umgekehrt [48].

Vor allem unter diesem wichtigen Aspekt sollen nun im Folgenden die unterschiedlichen Möglichkeiten zur Identifikation und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen dargelegt und bewertet werden.

Einleitung

1.3.1 Immunhistochemische Verfahren

Hauptanwendungsgebiet immunhistochemischer Verfahren stellt die Erkennung lymphogener oder hämatogener Tumorzell dissemination bei Patienten ohne klinischen oder histopathologischen Beweis von disseminierten Tumorzellen dar. Selten wurden bisher derartige Methoden eingesetzt, um residuale Tumorzellen an den Resektionsrändern nach primärer chirurgischer Therapie nachzuweisen [31, 37, 53].

Optimale Zielantigene sollten ubiquitär in malignen Zellen exprimiert werden, jedoch nicht auf anderen Zellen nachweisbar sein. In der zum Teil jedoch enorm hohen physiologischen (Hintergrund-) Expression von verwendeten Zielantigenen liegt allerdings der große Nachteil derartiger Nachweismethoden. Hierbei handelt es sich zum einen um Proteine mit gewebespezifischen Expressionsmustern wie z.B. Cytokeratine oder Membranantigene, zum anderen wird auch die in Tumorzellen vorhandene Überexpression bestimmter Proteine, die auch in nicht-neoplastischen Zellen vorkommen und elementare Zellfunktionen steuern, für den Nachweis eingesetzt (z.B. mutiertes p53, c-erbB-2, HER-2/neu) [31].

Eine Differenzierung zwischen nicht-neoplastischen Zellen und Tumorzellen ist auf die dargelegte Art und Weise nur möglich, wenn die Überexpression bestimmter Antigene in sehr hohem Maße vorliegt. Häufig entziehen sich allerdings die entsprechenden Proteine den Nachweismethoden nahezu gänzlich. Ein Grund hierfür liegt in den unterschiedlichen Expressionsstärken der Zielantigene. Das jeweilige mutierte Protein wird (abhängig vom jeweiligen histologischen Typ des Primärtumors) nicht in allen malignen Zellen gleichermaßen exprimiert. Weiterhin sind auch die Affinität der verwendeten Antikörper und die unterschiedlichen Verfahren zur Sichtbarmachung der Antikörperreaktionen wichtige Einflußgrößen, die Sensitivität und Spezifität immunhistochemischer Methoden beeinflussen [31].

Einleitung

Optimierte und standardisierte immunhistochemische Verfahren können eine disseminierte Tumorzelle unter 10^5 - 10^6 nicht-neoplastischen Knochenmarkszellen identifizieren [7]. Obwohl die prognostische Wertigkeit hämatogener und lymphatischer Krebszell dissemination für viele Entitäten nachgewiesen werden kann [42, 47], hat diese Methode keinen Einzug in die klinische Routine gefunden, da sie die wiederholte aufwendige zytologische Untersuchung positiver Zellen erfordert, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Außerdem gehen während der Karzinogenese niedrig differenzierter Krebsarten im Zuge des Dedifferenzierungsprozesses häufig auch Zielantigene verloren, was zusammen mit den anderen bereits beschriebenen Nachteilen dieser Methode dazu führte, dass eine Reihe von reproduzierbaren Nachweisverfahren entwickelt wurden, die nicht mehr die Proteine selbst als Endprodukte der Proteinbiosynthese als Zielstruktur haben, sondern bereits auf der Stufe der Nukleinsäuren ansetzen [31].

1.3.2 Nachweisverfahren auf DNA-Ebene

Maligne Zellen sind durch verschiedenste genetische und epigenetische Veränderungen charakterisiert. Am häufigsten werden somatische Punktmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen beobachtet. Des Weiteren sind chromosomale Aberrationen, wie Rearrangements, Deletionen, Amplifikationen oder Aneuploidie, Zeichen genomischer Instabilität.

Eine große methodische Bandbreite wurde zur Identifikation von Tumorzellen in klinischen Proben entwickelt. Ein Hauptvorteil von auf DNA-Nachweis basierenden Ansätzen stellt die Tatsache dar, dass genomische DNA im Vergleich zu RNA oder auch zu Proteinen relativ stabil ist. Folglich fällt auch der Sensitivitätsverlust aufgrund enzymatischer Abbauprozesse während Transport oder Aufbewahrung der Proben geringer aus. Jedoch ist die Sensitivität insgesamt von Methoden zum Nachweis tumorassoziierter DNA-Veränderungen deutlich niedriger im Vergleich zu RT-PCR oder auch Immunzytologie [31].

Einleitung

Onkogene und Tumorsuppressorgene

Exemplarisch sollen zwei Vertreter aus dieser Gruppe dargestellt werden:

K-ras: Abhängig vom jeweiligen Tumortyp variiert die Häufigkeit von Mutationen im Bereich des K-ras-Genes sehr stark. So treten diese z.B. überhaupt nur in ca. 50% aller kolorektalen Karzinome auf [52]. Somit ist zunächst erst eine Untersuchung des Primärtumors auf K-ras-Mutationen notwendig, bevor diese zur Identifikation von disseminierten Tumorzellen herangezogen werden können. Hinsichtlich der Sensitivität bezüglich der Erkennung von disseminierten Tumorzellen eignet sich ein derartiger Ansatz nur für Materialien mit hoher Tumorzell-dichte. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Tumorzelle unter 10^4 normalen Zellen [52, 4].

p53: Bei p53 handelt es sich um das Gen, das am häufigsten Mutationen in menschlichen Tumoren aufweist. Sein Nutzen für die Identifizierung von Krebszellen wird jedoch durch das extrem breite Spektrum an Mutationen beschränkt. Zwar konnten einige sogenannte „hot spot codons“ ausgemacht werden, in denen sich gehäuft Mutationen abspielen, diese vereinigen jedoch lediglich 20-30% aller bisher bekannten p53-Mutationen auf sich [4].

Deletionen, Amplifikationen und Translokationen

Umfassen derartige chromosomale Veränderungen Bereiche, die größer als eine Megabase sind, so können sie mit Hilfe der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH) analysiert werden. Diese Technik eignet sich besonders zur Untersuchung bestimmter an der Karzinogenese beteiligter Genloci, hat sich aber aufgrund mangelnder Sensitivität als ungeeignet für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen erwiesen [33].

Einleitung

Chromosomale Rearrangements

Werden während der Zellteilung bestimmte Chromosomenbereiche in falscher Art und Weise wieder zusammengefügt, so kann dies mit Hilfe der sogenannten Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) aufgezeigt werden. Mit der Fähigkeit, maximal eine maligne Zelle unter 10^3 Zellen ohne chromosomales Rearrangement zu erkennen, ist allerdings auch diese Methode nicht ausreichend sensitiv zur Erkennung von disseminierten Tumorzellen [17].

Epigenetische Veränderungen und Analyse von Mikrosatelliten

Unter epigenetischen Veränderungen versteht man die Veränderung der Genexpression, die durch hereditäre, aber potentiell reversible Veränderungen in der DNA-Methylierung und/oder Chromatinstruktur kontrolliert wird. In vielen soliden Tumortypen bedingt die Hypermethylierung von Promotorregionen die funktionelle Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Altersabhängig wurde jedoch in gesunder Kolon-Mucosa eine Hypermethylierung von bis zu 50% der Promotorregionen der Gene vorgefunden, die für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms durch epigenetische Veränderungen verantwortlich gemacht werden [1]. Zudem können methylierte Allele in einem Überschuss nicht-methylierter Allele in einer klinischen Probe lediglich mit einer Sensitivität von $1:10^4$ erkannt werden [20].

Mikrosatelliten stellen kurze repetitive Sequenzen in nicht-kodierenden Genabschnitten dar. Aufgrund ihrer polymorphen Charakteristik dienen sie als Marker für die beiden unterschiedlichen Allele eines Genlocus. Sowohl der Verlust eines Allels (loss of heterozygosity, LOH) als auch das Auftreten zusätzlicher Allele (microsatellite instability, MSI) zeigt genomische Instabilität und bedingt häufig die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in malignen Zellen. Sowohl LOH als auch MSI sind jedoch nicht auf maligne Zellen begrenzt, sondern finden sich ebenso in prä-malignen oder gesunden Zellen, die einer chronischen Entzündung oder bestimmten Karzinogenen ausgesetzt sind. Die zusätzlich nur geringe Sensitivität begrenzt zusätzlich den diagnostischen Wert dieses Ansatzes. Es kann lediglich eine Tumorzelle in 500 malignen Zellen erkannt werden [31].

Einleitung

1.3.3 Nachweisverfahren auf mRNA-Ebene am Beispiel der RT-PCR

mRNA-Moleküle können als höchst sensitiver Marker zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen herangezogen werden. Denn während freie RNA, die von Zellen von Zeit zu Zeit abgegeben wird, oder RNA aus apoptotischen Zellen in normalen Körperflüssigkeiten oder Geweben durch ubiquitär vorkommende Enzyme (RNasen) sofort abgebaut wird, zeigt der Nachweis von zellulären mRNA-Markern das Vorhandensein lebendiger Zellen in der untersuchten Probe an [57]. In Zusammenhang mit der ebenfalls in hohem Maße sensitiven Methode der RT-PCR gilt es nun, ein geeignetes Zielmolekül zu finden, um den Nachweis auch mit der notwendigen Spezifität durchführen zu können. Stellvertretend für eine große Anzahl an mRNA-Markern (z.B. CK 19, CK 20, β -HCG, etc.) für residuale Tumorzellen soll an dieser Stelle das Carcinoembryonale Antigen (CEA) genannt werden. In hohem Maße exprimiert findet sich dieser Marker in einer großen Anzahl an Neoplasien, besonders aber in gastrointestinalen Tumoren [36]. Hier stellt seine Anwesenheit einen negativen Prognosefaktor für den weiteren Verlauf dar [18]. Mit Hilfe verschiedenster Analysemethoden (PCR, Agarose-Gel-Elektrophorese, Southern Blot) kann eine Sensitivität beim Nachweis zirkulierender Tumorzellen in einem Bereich zwischen $1 / 10^5$ [36] bis $1 / 10^7$ [16] Zellen erreicht werden. Dies stellt eine erhebliche Steigerung der Sensitivität im Vergleich der bislang angesprochenen Methoden dar.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass CEA ebenso in gesunder kolorektaler Mukosa [36] und normalen Blutzellen, besonders bei Patienten, die an einer entzündlichen Krankheit litten [28, 9, 25, 6], exprimiert wird. Diese Hintergrundexpression schränkt die Tumorspezifität in erheblichem Maße ein und führt daher häufig zu falsch positiven Ergebnissen.

Es gilt nun also, ein Marker-Gen zu finden, das gleichzeitig ein möglichst hohes Transkriptionslevel in malignen Zellen und gleichzeitig eine möglichst geringe Transkriptionsrate in gesunden, nicht-malignen Zellen aufweist, um eine störende Hintergrundexpression möglichst komplett auszuschalten. Gleichzeitig muß durch intronüberspannendes Design der Primer sichergestellt werden, dass ebenfalls keine genomische DNA amplifiziert wird. Wir haben uns zum Ziel gesetzt, all diese Vorgaben in einer Nachweismethode zu vereinen. Der Nutzen eines sensitiven und spezifischen Nachweises eines

Einleitung

derartigen Markers könnte dann noch über den rein diagnostischen Aspekt hinausgehen. Denn gelänge es zuverlässig, diejenigen Patienten zu identifizieren, die an einer „Minimal Residual Disease“ leiden, so könnte die gleiche Struktur, die für diagnostische Zwecke genutzt wird, gleichzeitig als Target für spezifische adjuvante Immuntherapieverfahren verwendet werden, um die Häufigkeit des späten Auftretens von Metastasen trotz erfolgter R0-Resektion zu reduzieren.

2. Material und Methoden

2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut

Dieser erste Schritt der Probenaufarbeitung verfolgte das grundlegende Ziel, nur ganze Zellen zu isolieren, deren RNA später für die PCR auf der Suche nach Tumorzellen eingesetzt werden kann, denn nur intakte Tumorzellen in der Zirkulation sind potentiell in der Lage, später Metastasen zu bilden. Es galt, die Zellfraktion der mononukleären Zellen aus der Vollblutprobe zu isolieren, da sich hierin auch die Tumorzellen befinden. Durch dieses wesentliche Prinzip wurde verhindert, dass freie RNA von beschädigten oder schon früher zugrunde gegangenen Zellen falsch positive Ergebnisse liefert. Als Untersuchungsmaterial verwendeten wir jeweils ein prä- und postoperativ abgenommenes EDTA-Vollblutröhrchen mit jeweils 10 ml zentralvenösen Blutes. Durch die Verwendung zentralvenösen Blutes sollte ein möglicher Filtereffekt der Lunge ausgeschaltet werden. Durch die Untersuchung von prä- und postoperativen Proben wollten wir den intraoperativen Effekt der Manipulation am Primärtumor auf eine spätere Disseminierung untersuchen. Zusätzlich analysierten wir auf dieselbe Art und Weise wie das zentralvenöse Vollblut 100 ml einer im Rahmen der Operation durchgeführten Peritoneallavage. Diese erfolgte präoperativ, unmittelbar nach Laparotomie, noch vor jeglicher Präparation oder Manipulation im Bereich des Tumors. Die gesamte Probengewinnung und die sich daran anschließenden Schritte der Peritoneallavage-Untersuchungen erfolgten ausschließlich durch meine Person. Alle abgenommenen Proben wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert und innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet.

Jede Vollblutprobe von 10 ml wurde jeweils mit 5 ml HANKS´ Salt Solution (HANKS´ Salt Solution (1x), Biochrom AG, Berlin, Cat.No. 22045) versetzt, in ein 15 ml Röhrchen umgefüllt und anschließend bei 170 x g für zehn Minuten zentrifugiert, um die Probe zu waschen. In der Zwischenzeit bereiteten wir für jede Probe ein neues 15 ml Röhrchen mit jeweils 6,5 ml Percoll™ 50% vor. Percoll™ besteht aus kolloidalen Silica-Partikeln, die mit Polyvinylpyrrolidone (PVP) beschichtet sind. Die Zentrifugation mit Percoll™ resultiert in der spontanen Bildung eines Dichtegradienten aufgrund der Heterogenität der Partikelgröße im Medium. Die niedrige Osmolalität von Percoll™ (< 30mOs/kg H₂O) erlaubt eine

Material und Methoden

präzise Anpassung an die physiologischen Gegebenheiten und die Trennung intakter, lebender Zellen. Percoll™ ist nicht in der Lage, biologische Membranen zu durchdringen, ist nicht zell-toxisch und bei jedem pH-Wert und jeder Osmolalität verwendbar. Durch die niedrige Viskosität (<15 cP) kann eine schnelle Bildung eines Dichtegradienten und somit eine schnelle Trennung der Partikel erzielt werden. Es zeigte sich außerdem in anderen Studien, in denen verschiedene Percoll-Verdünnungen miteinander verglichen wurden, dass mit Percoll™ 50% die höchste Zellausbeute erzielt werden konnte (persönliche Kommunikation mit CA Klein, unpublizierte Daten).

Percoll™ 50%-Herstellung:

100 ml Percoll 100% (Percoll™, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala) wurden in einem sterilen Gefäß mit 9 ml 10x HANKS´ Salt Solution (HANKS´ Balanced Salts (10x) Gibco™ Invitrogen Corporation, UK, Cat.No. 14060-040) vermengt, anschließend wurde der pH-Wert mittels 50%iger HCl-Lösung auf 7,4 eingestellt und im Verhältnis 1:1 mit einer sterilen 0,9%igen NaCl-Lösung verdünnt. Schließlich wurde das Gemisch noch steril filtriert, um jeglicher Kontamination durch Bakterien, Pilzen etc. vorzubeugen; dabei verwendeten wir Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Sterifix 0,2 µm, Luer Lock, Braun, Mat.No. 4099206).

Nach der ersten zehnminütigen Zentrifugation der Mischung aus Vollblut und HANKS wurde nun vorsichtig die obere Fettschicht steril abpipettiert und verworfen, jedoch möglichst mindestens 9 ml belassen. Mit einer neuen sterilen Pipettenspitze wurde das so gewonnene Zentrifugat auf das vorgelegte Percoll™ 50% (über langsames schräges Einlaufen über die Innenwand des Röhrchens) geschichtet, ohne dass sich beide Phasen miteinander vermischten. Es folgte eine Zentrifugation über den Dichtegradienten bei 979 x g für 15 Minuten. Anschließend waren drei Phasen im Röhrchen erkennbar: oben das Serum, in der Mitte die Interphase mit den mononukleären Zellen und schließlich unten Percoll vermischt mit Erythrozyten und Zellfragmenten.

Material und Methoden

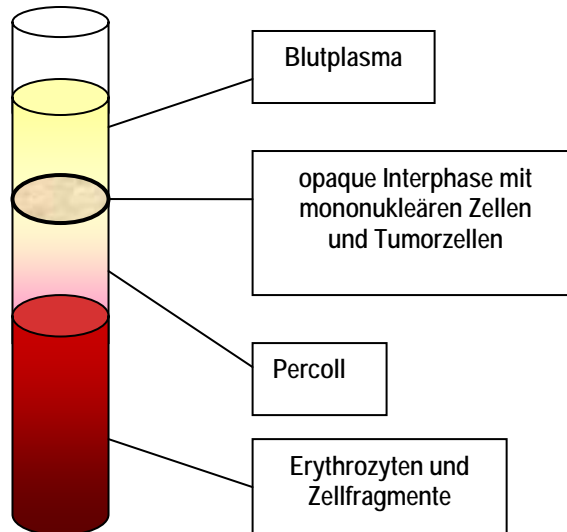


Abbildung 3: Die unterschiedlichen Phasen nach Aufreinigung der Probe über Percoll

Der Serumüberstand wurde bis auf 2 ml über der Interphase abpipettiert und verworfen. Die gesamte Interphase wurde dann vorsichtig abgenommen, möglichst ohne die unterste Phase miteinzubeziehen, und in ein neues 50 ml Röhrchen gegeben. Die untere Phase wurde schließlich verworfen.

Das neue 50 ml Röhrchen, das nun die gesamte Interphase mit den mononukleären Zellen inklusive der Tumorzellen beinhaltet, wurde mit PBS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und bei 524 x g zehn Minuten lang zentrifugiert, um damit die Zellen nochmals zu waschen und alle anderen Verunreinigungen wie PercollTM-Rückstände oder Erythrozyten zu trennen. Die Zellfraktion der mononukleären Zellen war nach der Zentrifugation als weißes Pellet am Boden des Röhrchens sichtbar. Der PBS-Puffer wurde anschließend bis auf ca. 1 ml Restvolumen abpipettiert und die mononukleären Zellen darin suspendiert. Durch nochmaliges Pipettieren der Zellsuspension wurde das exakte Restvolumen bestimmt.

Um die Ausbeute quantitativ zu erfassen, vermischten wir 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau in einem sterilen Eppendorf-Gefäß. Die Zellen wurden damit angefärbt und konnten in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt werden und die Zellzahl pro µl bzw. die absolute Zahl der

Material und Methoden

isolierten Zellen ermittelt werden. Gleichzeitig konnte auch beurteilt werden, ob die Zellen vital geblieben waren, da nicht-vitale Zellen im Gegensatz zu intakten Zellen den Farbstoff intrazellulär aufnahmen und sich tief blau anfärbten.

2.2 Zelllysierung und Kryokonservierung des Lysats

Die restliche Zellsuspension wurde erneut bei 524 x g für zehn Minuten zentrifugiert, um ein reines Zellpellet (10^6 bis 10^7 Zellen) zu erzielen. Der Überstand wurde abgenommen, zu den Zellen gaben wir 600 μ l eines Gemisches des Lysepuffers RLT-Puffer (Qiagen®) mit β -Mercaptoethanol (Mischverhältnis: 10ml RLT-Puffer zu 100 μ l β -Mercaptoethanol).

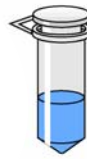
Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen lysiert, das β -Mercaptoethanol diente gleichzeitig zur Stabilisierung der RNA. Die daraus entstehenden 600 μ l Zelllysats wurden auf eine QIA Shredder-Säule (QIA Shredder™, Cat.No. 79654) aufgetragen und für zwei Minuten bei 12 000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Dadurch wurde die Probe von störenden Zellresten und –fragmenten gereinigt, die Säule selbst wurde anschließend verworfen. Die so erhaltene Probe wurde schließlich in ein steriles 1,5 ml Eppendorff-Gefäß transferiert und bis zur Isolierung der RNA bei -80°C aufbewahrt.

2.3 RNA-Isolierung mit RNeasy® Mini Kit

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den mononukleären Zellen verwendeten wir das RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen (RNeasy® Mini Kit, Qiagen, Cat.No. 74104). Zu Beginn der Experimente haben wir versucht, die Gesamt-RNA mit der Phenol-Chloroform-Methode (Trizol, Invitrogen) zu isolieren, welche wir allerdings aufgrund der geringen Ausbeute durch das oben genannte kommerziell erhältliche Kit ersetzen. Die Phenol-Chloroform-Methode wurde bereits im Rahmen einer anderen Dissertationsarbeit untersucht, erschien jedoch für die Untersuchung von disseminierten Tumorzellen nicht geeignet. Das in dieser Arbeit verwendete Säulensystem beruht auf dem Grundprinzip, dass nach Zugabe von Ethanol zum Zellysat maximal 100 µl RNA > 200 Basen selektiv an die Silica-Gel-Membran im Inneren der Säule bindet, während hingegen Kontaminationen, DNA und Proteine effektiv ausgewaschen werden können. Die an die Membran gebundene, qualitativ hochwertige RNA kann schließlich mit RNase-freiem Wasser eluiert werden. Abbildung 4 zeigt schematisch die einzelnen Schritte der RNA-Isolierung.

Material und Methoden

- ① Mononukleäre Zellen werden in Gemisch aus RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol lysiert

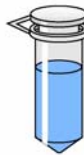


- ② Zellysate wird auf die QIA-Shredder-Säule aufgetragen und zentrifugiert



Zentrifugieren befreit Probe von Zellresten und -fragmenten

- ③ Zugabe von Ethanol zur homogenisierten Probe zur Verbesserung der Bindungsvoraussetzungen an Membran



- ④ Auftragen des Lysat-Ethanol-Gemisches auf die RNeasy Mini Column[®]



Total RNA



Durch Zentrifugation bindet die Total RNA an die Membran

- ⑤ Waschen der Membran und DNA-Verdau zur Entfernung von Kontaminationen



Eluieren der Total RNA mit RNase-freiem Wasser

- ⑥ Auffangen des Eluats und Einfrieren bei -80°C

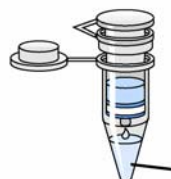


Abbildung 4: RNA-Isolation

Material und Methoden

Nach zehnmütigem Auftauen der Proben bei 37°C im Wasserbad gaben wir 600 µl Ethanol 70% zu dem homogenisierten Zellysat, das durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt wurde.

700 µl des so entstandenen Probematerials (inklusive eines eventuell entstandenen Präzipitats, das die weitere Isolierung allerdings nicht weiter beeinträchtigt) wurden auf eine RNeasy Mini Column® aufgetragen, welche sich in einem 2 ml Sammelgefäß befindet. Nach Schließen des Deckels wurde die ganze Säule für 15 Sekunden bei 12 000 rpm zentrifugiert und das Durchflussvolumen weggeschüttet. Diese Schritte wurden mit den verbleibenden 500 µl des Zellysat-Ethanol-Gemisches wiederholt. Die im Lysat enthaltene RNA war nun an die Membran im Inneren der Säule gebunden. Anschließend trugen wir 350 µl RW1 Waschpuffer (im RNeasy Mini Kit enthalten) auf die Säule auf und zentrifugierten sie bei 12 000 rpm für 15 Sekunden; das Durchflussvolumen wurde entsorgt und das Sammelgefäß erneuert.

Um eventuellen Verunreinigungen der RNA-Probe durch unspezifische genomische DNA entgegenzuwirken, welche dann später die Ergebnisse der PCR beeinflussen kann, entschlossen wir uns zum optionalen DNA-Verdau während der RNA-Aufreinigung mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets (Qiagen, Cat.No. 79254). Hierbei wurde zuerst die in Pulverform vorhandene DNase I (1500 Kunitz units) mit 550 µl RNase-freien Wassers aufgelöst, um die für die weiteren Schritte notwendige DNase I Stock Solution zu erhalten. Für jede Probe verwendeten wir 10 µl der DNase I Stock Solution, die mit 70 µl RDD Puffer (im RNeasy Mini Kit enthalten) zum DNase I Incubation Mix vermenget wurden. Diese 80 µl Incubation Mix wurden direkt senkrecht auf die Silica-Gel-Membran der Säule aufgetragen, um für 15 Minuten bei Raumtemperatur einwirken zu können. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Säule erneut mit 350 µl RW1 Waschpuffer gereinigt, für 15 Sekunden bei 12 000 rpm zentrifugiert, das Durchflussvolumen entsorgt und das Sammelgefäß erneuert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit ebenfalls im RNeasy Mini Kit enthaltenem RPE-Puffer, der allerdings als Konzentrat mitgeliefert wird und zu dem vor Gebrauch vier Volumenanteile Ethanol 100% (44 ml) zur Verdünnung hinzugegeben

Material und Methoden

werden müssen. 500 µl des so erhaltenen RPE-Puffers (inklusive Ethanol) wurden auf jede Säule aufgetragen und für 15 Sekunden bei 12 000 rpm zentrifugiert. Nach Entsorgen des Durchflussvolumens wurden erneut 500 µl des RPE-Puffers auf die Säulen aufgetragen, anschließend aber zwei Minuten lang bei 12 000 rpm zentrifugiert und das Durchflussvolumen entsorgt, um die Silica-Gel-Membran zu trocknen. Um wirklich sicher zu gehen, dass keinerlei Reste des RPE-Puffers auf der Membran zurückblieben, wurde das Sammelgefäß erneut gewechselt und die Säule mit offenem Deckel für eine weitere Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, wodurch ein sicheres Trocknen der Membran gewährleistet war.

Zum Eluieren der so gewonnenen und gereinigten RNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß gesteckt und 90 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silica-Gel-Membran pipettiert. Durch Zentrifugieren für eine Minute bei 12 000 rpm wurde die an die Membran gebundene RNA in das Sammelgefäß ausgewaschen. Es zeigte sich, dass mehrmaliges Eluieren mit geringeren Volumina keine höhere RNA-Ausbeute ermöglichte. Schließlich wurde die erhaltene RNA-Konzentration photometrisch ermittelt. Hierzu wurde zuerst ein Leerwert mit 60 µl RNase-freiem Wasser bestimmt und das Photometer damit geeicht. Jeweils 60 µl des Eluats wurden blasenfrei in eine Photometer-Kuvette pipettiert und vermessen. Durch Bestimmung des eluierten Volumens mittels Pipette konnte somit auch die Gesamtmenge an erhaltener RNA errechnet werden. Die durch diesen Prozess gewonnene RNA wurde bis zur cDNA-Synthese bei -80°C aufbewahrt.

2.4 cDNA-Synthese

In diesem Schritt wurde die erhaltene Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe einer reversen Transkription umgeschrieben. Alle Reagenzien für die Reverse Transkription waren in einem kommerziell verfügbaren Kit der Firma Roche erhältlich (LightCycler CK20 Quantification Kit, Roche, Cat.No. 3118835).

Als zentrales Enzym in dieser Reaktion verwendeten wir die sogenannte AMV-Reverse-Transkriptase. Allerdings verwendeten wir keine genspezifischen Primer, sondern sogenannte Random Hexamer Primer. Diese stellen eine Mischung verschiedener Oligonukleotide dar, die alle möglichen Sequenzen für die Bildung eines sechs Basen langen Abschnitts beinhaltet. Sie sind in der Lage, an jeweils komplementäre Stellen zu binden und somit die cDNA-Synthese zu starten.

Der Vorteil gegenüber genspezifischen Primern lag für uns vor allem in der Tatsache, dass wir damit in einem einzigen Ansatz die mRNA-Sequenzen sowohl für das Housekeeping Gene (Cyclophilin B), welches die Kontrolle des korrekten technischen Ablaufs der PCR ermöglicht, als auch für das eigentliche Target Gene (MAGE) in cDNA umschreiben konnten.

Speziell bei diesem Schritt war es essentiell, jegliche Art von Kontamination strengstens zu vermeiden. Wie bei den vorherigen Schritten verwendeten wir zur Reinigung des Arbeitsplatzes und aller Arbeitsmaterialien neben einer 70 %igen Ethanollösung eine spezielle Lösung zur Dekontamination von DNA, RNA und RNasen (RNaseFree®, Roth).

In die cDNA-Synthese setzten wir von jeder Probe 500 ng RNA jeder Probe in die Reaktion ein. Zuerst galt es, abhängig von der gewonnenen RNA-Konzentration entweder durch Eindampfen oder Verdünnen mit RNase-freiem Wasser ein jeweils identisches Ausgangsvolumen von 10 µl herzustellen, so dass eine Konzentration von 50 ng RNA pro µl Probelösung entsteht.

Material und Methoden

Um eine Reverse Transkription überhaupt erst zu ermöglichen, müssen alle 10 µl RNA-Proben zuerst in ein steriles PCR-Tube gegeben und im ThermalCycler für 15 Minuten bei 65°C denaturiert werden. Dadurch werden alle zufällig entstandenen Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der RNA-Moleküle zwischen komplementären Abschnitten gelöst und eine Bindung der Primermoleküle überhaupt erst ermöglicht. Um die Bildung von Kondensstropfen in den Tubes zu verhindern, wurden die Denaturierung und auch alle weiteren Reaktionen im ThermalCycler immer mit beheiztem Deckel durchgeführt. Im Anschluß an die Denaturierungsphase werden alle Proben auf Eis (0°C) gestellt, um eine spontane Rückfaltung der Moleküle zu verhindern.

Während die Denaturierung im ThermalCycler lief, bereiteten wir den Master-Mix für die eigentliche cDNA-Synthese vor. Für jede Probe wurden jeweils 4 µl Reverse Transcriptase Reaction Mix, 2 µl Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) Mix, in dem zu gleichen Teilen dATP, dCTP, dGTP und dTTP vorhanden waren, 2 µl steriles RNase-freies Wasser, 1 µl Random Hexamers p(dN)₆ (0,1 A₂₆₀) und 1 µl AMV-Reverse Transkriptase (25 units/µl) verwendet.

Aufgrund der zu erwartenden Pipettierfehler, wenn man jede Probe einzeln vorbereiten würde, multiplizierten wir die jeweiligen Volumina der zu verwendenden Reagenzien mit der Anzahl der Proben, um eine größere Menge Master Mix in einem sterilen 1,5 ml Eppendorff-Gefäß herzustellen. Zur Kontrolle wurde zusätzlich jeweils eine Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) und eine Positivkontrolle aus reiner MAGE-RNA (Calibrator-RNA, search LC, Heidelberg) in die cDNA-Synthese eingesetzt, um Vergleichbarkeit der Proben untereinander gewährleisten zu können.

Im Folgenden wurden dann jeweils 10 µl Master Mix mit 10 µl denaturierter RNA-Lösung durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Die eigentliche Reverse Transkription lief dann im ThermalCycler in drei Schritten ab:

Material und Methoden

Zuerst kam es während der zehnmütigen Annealing-Phase bei 25°C zur Bindung der Primer an die RNA. Es folgte die Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkription) bei 42°C für 60 Minuten. Schließlich wurde die Reaktion durch eine fünfminütige Inaktivierungsphase bei 95°C beendet, indem das für den Umschreibevorgang verantwortliche Enzym, die Reverse Transkriptase, durch die Hitze denaturiert wurde. Damit konnte auch sichergestellt werden, dass in später folgenden Schritten keine unerwünschten Nebenreaktionen abliefen. Die auf diese Weise neu synthetisierten cDNA-Proben wurden bis zur RT-PCR bei -20°C aufbewahrt.

2.5 Quantitative RT-PCR

Als eigentliche Nachweisreaktion zur Detektion von disseminierten Tumorzellen setzten wir die quantitative Real Time-PCR mit dem LightCycler™-Instrument ein, die Transkripte der MAGE (= Melanoma-Antigen Genes)-A-Familie (A1, A2, A3, A4, A6) erkennt. Dieser letzte Schritt im Rahmen der Probenverarbeitung stellt das zentrale Element dieser Untersuchung dar. In sehr zeitintensiver Arbeit gelang uns die Realisierung der im Folgenden beschriebenen PCR, welche bisher noch nirgends etabliert war.

Zum Nachweis der durch PCR neu synthetisierten primerspezifischen DNA-Sequenzen kam ein unspezifischer Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green I) zum Einsatz, der sich in die fertig synthetisierten doppelsträngigen DNA-Moleküle einlagert und von dort aus Fluoreszenzsignale aussendet. Durch die Messung der Fluoreszenz während der Reaktion – daher der Name *Real Time*-PCR – erhält man am Ende eine exponentielle Kurve, welche die Menge an amplifizierter DNA darstellt.

Um sicherzugehen, daß wirklich nur die gewünschten Gensequenzen und keine unspezifischen DNA-Sequenzen während der PCR amplifiziert wurden, kam am Ende eine Schmelzkurvenanalyse zum Einsatz, die auf dem grundlegenden Prinzip beruht, dass unterschiedliche Gensequenzen

Material und Methoden

unterschiedliche Schmelztemperaturen haben. Waren die Schmelzkurven von Positivkontrolle (reiner MAGE-cDNA) und zu untersuchender Probe identisch, war also auch der Nachweis erbracht, dass wirklich nur der gesuchte DNA-Abschnitt vervielfältigt wurde. Bereits vom Hersteller der Primer war eine Gelelektrophorese des PCR-Produktes vorgenommen worden, ebenso war dort eine qPCR mit den Primern vorgenommen worden und es wurde mitsamt der Primer eine spezifische Schmelzkurve für die spezifische Bande auf dem Agarose-Gel zur Verfügung gestellt. Aus diesem Grunde haben wir auf eine erneute Überprüfung (z.B. durch Gelelektrophorese oder Sequenzierung) verzichtet.

Hauptproblem vieler bisher verwendeter RT-PCR-Ansätze zum Nachweis disseminierter Tumorzellen war in erster Linie, dass die Hintergrundexpression der zum Tumorzellnachweis eingesetzten Tumorassoziierten Antigene (wie z.B. CK20 oder CEA) in *nicht*-malignen Blutzellen die Spezifität des Ansatzes stark limitierte. In dieser Arbeit machten wir uns die außerordentlich spezifische Expression der MAGE-A-Genfamilie zu nutzen, die in vielen verschiedenen Tumortypen gefunden werden konnte, nicht jedoch in normalen nicht-tumorösen, adulten Geweben mit Ausnahme von Keimzellen des Hodens [12]. Die MAGE-Gene kodieren für Proteine, deren physiologische Funktion bisher ungeklärt ist und die erstmals bei Malignen Melanomen beschrieben wurden, wo sie als Tumorantigene von spezifischen T-Zellen erkannt wurden [29].

Auch die Sensitivität vieler bisheriger Nachweismethoden war häufig stark eingeschränkt. Die Gründe hierfür lagen vor allem in der Verwendung nur eines einzigen Markers pro Ansatz, zum anderen an dem zum Teil (von Haus aus) niedrigen Expressionsniveau des Markers oder einer erfolgten Herabregulation der Expression, bedingt durch die Tumorzellheterogenität. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Tumortypen zum Teil sehr unterschiedliche Expressionsmuster der verschiedenen MAGE-A-Gene aufweisen [29]. Durch die Identifikation einer Consensus-Sequenz im Bereich der MAGE-A-Gene gelang es uns, unsere Primer so zu konstruieren, dass in einem Ansatz unterschiedliche MAGE-A-Subtypen (A1-A6) gleichzeitig nachgewiesen werden können. Zudem kann hierdurch sicher zwischen benignen und malignen Zellen unabhängig vom individuellen Expressionsmuster der

Material und Methoden

vorhandenen Tumorzellen unterschieden werden. Durch das intronüberspannende Primerdesign war gleichzeitig sichergestellt, dass eine Bindung praktisch ausschließlich an MAGE-Transkripten möglich ist.

Bezüglich des verwendeten Housekeeping-Genes zur Kontrolle des regelgerechten Ablaufs der PCR fiel unsere Wahl auf Cyclophilin B, das universell in allen anderen Blutzellen vorkommt und kaum reguliert wird, aber ein ähnliches Expressionsniveau wie MAGE-A aufweist. Auf diese Weise wird eine relative Quantifizierung zur späteren Auswertung ermöglicht.

Die Durchführung der PCR basierte auf speziell angefertigten LightCycler™-Primer Sets der search LC GmbH Heidelberg sowohl für Human MAGE-II (A1, A2, A3, A4, A6) als auch für Cyclophilin B. Abbildung 5 zeigt die Primersequenzen für die Erkennung von MAGE A1-A6. Die entsprechenden Primer für Cyclophilin B sind kommerziell bei search LC erhältlich.

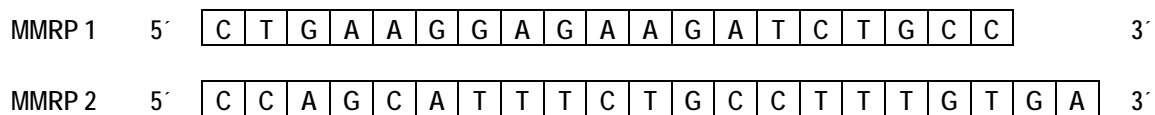


Abbildung 5: Multiple MAGE subtypes Recognizing Primers (MMRP)

Vor allem bei diesem letzten und zentralen Nachweisschritt galt es äußerst steril zu arbeiten und jegliche Kontamination zu vermeiden. Wir verwendeten daher ein eigenes Pipettenset, das im Labor ausschließlich zur Durchführung von PCR benutzt wird. Der Arbeitsplatz wurde erneut erst mit 70%igem Ethanol und anschließend mit RNase-free® gereinigt, bevor der Raum soweit abgedunkelt wurde, daß keine direkte Lichteinstrahlung auf den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff befürchtet werden mußte; dieser hätte sonst inaktiviert werden können.

Zuerst stellten wir das für die PCR notwendige Fluoreszenzfarbstoffgemisch her, dessen Inhaltsstoffe ebenfalls als kommerzielles Kit erhältlich sind (LightCycler FastStart DNA MasterSYBR Green I, Roche,

Material und Methoden

Penzberg). Enthalten sind zum einen die Fast Start Taq DNA-Polymerase zur Verlängerung der PCR-Produkte, eine modifizierte Form der thermostabilen rekombinanten Taq DNA-Polymerase. Diese ist bei Raumtemperatur aufgrund hitze-labiler aktivitätsblockierender Gruppen an bestimmten Aminosäureresten des Enzyms inaktiv. Erst hohe Temperaturen, idealerweise 95°C für maximal 10 Minuten, sind in der Lage, diese blockierenden Gruppen zu entfernen und das Enzym zu aktivieren. Dadurch wird die Kontamination durch unerwünschte, unspezifische Amplifikationsprodukte minimiert. Zum anderen ist der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I von zentraler Bedeutung, der spezifisch an doppelsträngige DNA bindet. SYBR Green I sendet erst nach erfolgter Bindung ein spezifisches Fluoreszenzsignal der Wellenlänge 530 nm aus, das vom LightCycler™-Instrument detektiert werden kann. Daher ist während der PCR ein Anstieg der SYBR Green-bedingten Fluoreszenz direkt proportional zur Anzahl der erzeugten doppelsträngigen DNA-Produkte.

Um zu beweisen, dass ausschließlich das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert wurde, wird am Ende der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wird das Reaktionsgemisch langsam auf 95°C erhitzt, was ein Schmelzen der doppelsträngigen DNA und damit auch einen entsprechenden Abfall der SYBR Green-Fluoreszenz bewirkt. Das LightCycler™-Instrument registriert kontinuierlich den Fluoreszenzabfall und zeigt diesen als Schmelz Gipfel an. Jeder Schmelz Gipfel repräsentiert die charakteristische Schmelztemperatur eines bestimmten DNA-Produkts (zu dem Zeitpunkt, zu dem es zu 50% doppelsträngig und zu 50% einzelsträngig vorliegt). Hat die PCR nur ein einziges Amplifikationsprodukt (Amplicon) hervorgebracht, wird die Schmelzkurve nur einen Schmelz Gipfel bei einer spezifischen Temperatur zeigen; sind Primer-Dimere oder andere nicht-spezifische Produkte entstanden, werden diese als zusätzliche Schmelz Gipfel bei anderen Temperaturen angezeigt.

Zur Herstellung des eben beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffgemischs (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I) pipettierten wir 60 µl des LightCycler FastStart Enzyms zum bereitgestellten LightCycler FastStart Reaction Mix SYBR Green I. Es entstand ein Gemisch, das die Fast Start Taq

Material und Methoden

DNA Polymerase, den SYBR Green Fluoreszenzfarbstoff, einen dNTP-Gemisch (mit dUTP anstatt dTTP), Reaktionspuffer und $MgCl_2$ enthielt. Das Gefäß, das dieses Gemisch enthielt, wurde sofort mit Alufolie zum Lichtschutz ummantelt.

Anschließend stellten wir den Master Mix her, eine Reaktionslösung, die abgesehen von der zu analysierenden Probe alle zur PCR nötigen Inhaltsstoffe besitzt. Dazu wurden nach kurzem Anzentrifugieren der Vorratsgefäße für jede Probe 6 μl steriles, PCR-taugliches Wasser, 2 μl (MAGE- bzw. Cyclophilin B) Primer Mix und 2 μl LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I vermischt. Da auch hier aufgrund der kleinen Volumina mit nicht unerheblichen Pipettierfehlern zu rechnen war, wurden die Volumina (wie bei der cDNA-Synthese bereits beschrieben) mit der Anzahl der Proben multipliziert und das insgesamt benötigte Volumen in einem sterilen 1,5 ml Eppendorff-Gefäß angemischt und von dort aus später auf die einzelnen Proben aliquotiert.

Während die bei $-20^\circ C$ gelagerte cDNA in einem Kälteblock langsam auftaute, wurden entsprechend der Anzahl der in der PCR zu untersuchenden Proben nun sterile PCR-Tubes bereitgestellt, in denen das in das LightCycler TM-Instrument einzusetzende Reaktionsgemisch hergestellt wurde. Jede zu untersuchende cDNA-Probe (Template-cDNA) inklusive der Positivkontrolle (HT 29-Tumorzell-cDNA) und der Negativkontrollen (steriles Wasser und in die cDNA-Synthese eingesetztes steriles Wasser) wurde sowohl auf das Vorhandensein des Housekeeping Genes Cyclophilin B als auch eines Target Genes der MAGE-A-Familie (in zwei jeweils getrennten Reaktionsgefäßen mit den jeweils passenden Primern) analysiert. Für jede Probe wurden erst 6 μl steriles, PCR-taugliches Wasser vorgelegt und mit anschließend 10 μl des passenden Master Mixes (mit Cyclophilin B- oder MAGE-A-Primern) und 4 μl Template-cDNA vermischt. Um Kontaminationen zu vermeiden, begannen wir mit dem Pipettieren der Negativkontrollen, fuhren mit den Patientenproben fort und bereiteten die Positivkontrollen erst am Ende vor. Alle so gemischten PCR-Tubes wurden kurz anzentrifugiert, dadurch gut gemischt und anschließend wieder auf Eis gelegt.

Material und Methoden

Im Folgenden wurde der im Kühlschrank gelagerte Kühl-Kapillarblock (Roche®) mit den sterilen LightCycler™-Glaskapillaren bestückt, in welchen dann später die eigentliche Nachweisreaktion im LightCycler™-Instrument abläuft. Diese Glaskapillaren dienen als optisches Element, das in der Lage ist, das Licht zu bündeln und damit das ausgesandte Signal an der Spitze der Kapillare zu bündeln. Dadurch wird die Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale aus derart geringen Probenvolumina überhaupt erst möglich. Der komplette Inhalt (20 µl) jedes PCR-Tubes wurde jeweils in eine Kapillare im Kühlblock übertragen. Mit speziellen Adaptern für die Zentrifuge ausgestattet konnte das gesamte Volumen blasenfrei in die Kapillare zentrifugiert werden (4 Minuten bei 660 rpm). Schließlich wurden alle vorbereiteten Kapillaren vorsichtig in ein LightCycler™-Proben-Karussell übertragen und in das LightCycler™-Instrument eingesetzt.

Beim LightCycler™-Instrument handelt es sich um ein sogenanntes Rapid Thermal Cycling-Gerät, welches sich in erster Linie die außerordentlich hohe Oberfläche der Glaskapillaren im Verhältnis zu ihren Volumina zu Nutze macht. Es ist in der Lage, höchsteffizient Hitze zu übertragen, eine grundlegende Voraussetzung für die Rapid Cycling-Technik, da Temperaturänderungen in sehr kurzer Zeit erzielt werden können. Dadurch ist das LightCycler™-Instrument in der Lage, 20-30 PCR-Zyklen in 20-30 Minuten durchzuführen. Das integrierte sogenannte Micro-Volume-Fluorimeter enthält eine Lichtquelle (Peak-Emission) von 470 nm und drei Filtersysteme, die die Erkennung von Licht drei verschiedener Wellenlängen während der PCR ermöglichen; für unsere PCR war die Registrierung von Licht der Wellenlänge 530 nm entscheidend. Über entsprechende Software kann das LightCycler™-Instrument von einem PC aus gesteuert werden und am Bildschirm online der Fortschritt der PCR nachvollzogen werden. Signale der Proben erhält man dadurch, dass die Maschine die Kapillaren im Karussell nacheinander über der optischen Einheit positioniert („cycling“) und Fluoreszenzsignale einmal pro Amplifikationszyklus für jede Kapillare gemessen werden. Die Software aktualisiert die Anzeige der Fluoreszenzsignale in *real-time* direkt nach jeder Messung. Die auf diese Weise erhaltenen

Material und Methoden

Daten können dann für die weitere Auswertung gesichert werden, so auch für eine relative Quantifizierung.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten Housekeeping Genes in Beziehung gesetzt. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienanzahlen oder –konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Genes wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. Die Vorteile dieser Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Housekeeping Gene betreffen.

Die eigentliche PCR-Reaktion ist in vier Schritte untergliedert. Zu Beginn erfolgt die Denaturierungsphase für 10 Minuten bei 95°C. Während alle anderen Enzyme aus den vorherigen Reaktionen zerstört werden, kann die Taq DNA-Polymerase erst bei derart hohen Temperaturen aktiviert werden (s.o.). Die Wasserstoffbrückenbindungen, mit denen die beiden DNA-Stränge verbunden sind, werden gelockert und damit die Voraussetzungen für die nachfolgenden Schritte geschaffen.

Während der sich daran anschließenden Amplifikationszyklen geschieht dann die Vervielfältigung des gesuchten Genes. Jeder der 40 durchgeführten Zyklen gliedert sich in drei aufeinanderfolgende Phasen: der 10 Sekunden dauernden Denaturierungsphase bei 95°C, während der die kongruenten DNA-Stränge entgültig in zwei DNA-Einzelstränge getrennt werden, folgt eine 10-sekündige Annealingphase bei 68°C, in der sich die Primer an die jeweils passende Stelle des DNA-Einzelstrangs anlagern und somit den Anfang der neu zu synthetisierenden Genabschnitts bilden. Während der Verlängerungsphase (16 Sekunden bei 72°C) lagert sich schließlich die Taq-DNA-Polymerase an und synthetisiert vom Primer ausgehend den restlichen Genabschnitt. Es entstehen also jeweils zwei neue

Material und Methoden

doppelsträngige DNA-Moleküle, in die sich der SYBR Green I-Fluoreszenzfarbstoff einlagern kann. Die abgegebene Fluoreszenz wird immer nach dem Annealing, vor der Elongationsphase gemessen.

Nach Abschluß der 40 Zyklen erfolgt dann die bereits beschriebene Schmelzkurvenanalyse durch langsames Erhitzen auf 95°C, bevor das Programm das Abkühlen des Geräts auf 40°C einleitet und bei erreichter Zieltemperatur die Proben schließlich entnommen werden können.

2.6 Zellverdünnungs-Experimente und Herstellung der Positivkontrollen

2.6.1 Kultivierung von HT 29 Zellen

Als Positivkontrolle verwendeten wir die humane Kolonkarzinomzelllinie HT 29, die bereits in zahlreichen Vorarbeiten sehr gut charakterisiert wurde und daher hervorragend als Referenz für den Nachweis disseminierter Tumorzellen geeignet ist. Die adhärent wachsenden epitheloiden Zellen bilden polarisierte Monolayer und große Kolonien. Die Zellen konnten erstmals 1964 durch J. Fogh [15] aus dem Primärtumor einer 44jährigen Kaukasierin mit einem Adenokarzinom des Kolons isoliert werden.

Tumorzelllinie	Ursprung	MAGE-1	MAGE-2	MAGE-3/6	MAGE-4	MAGE-12
HT 29	Kolon	+	+	+	+	+

Tabelle 1: MAGE-A-Charakterisierung der Kolonkarzinomzelllinie HT 29 nach [29]

Um kryokonservierte HT 29-Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen (ca. 1×10^7 Zellen pro ml) im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und die Zellen sofort mit 50 ml vorgewärmtem Kulturmedium (RPMI 1640-Basismedium, 10% (v/v) hitzeinaktives Fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 1% (v/v) Glutamax) gemischt; durch die Verdünnung des SDS enthaltenden Kryokonservierungsmediums konnten zytotoxische Wirkungen verhindert werden.

Material und Methoden

Anschließend wurde die Zellsuspension bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der dadurch entstandene Überstand abgenommen. Es folgte ein erneuter Waschgang mit 50 ml PBS mit konsekutiver Pelletierung der HT 29-Zellen.

Die Zellen wurden in frischem Kulturmedium aufgenommen und ca. 3×10^5 Zellen pro 75cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre (95% Luftfeuchtigkeit).

Das Passagieren der Zellen erfolgte ca. alle 2-3 Tage. Konfluent gewachsene Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 2-5 Minuten in 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert (0,5% Trypsin, 5,3 mM EDTA). Nach Absaugen der Trypsinlösung wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden gelöst und durch mehrfaches Pipettieren in mindestens der doppelten Menge an frischem Medium verteilt. Zur vollständigen Entfernung der Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen noch einmal für 10 min bei 500 x g zentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und mit einem Verdünnungsfaktor von 1:10 in einer neuen Kulturflasche aufgenommen.

Nach einer Woche konnten die Zellen geerntet werden. Nach Trypsinierung, Pelletierung, Waschen mit PBS und erneuter Pelletierung erfolgte die Einstellung der Konzentration auf 1×10^6 Zellen pro ml PBS. Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden diese mit Trypanblau versetzt. Während vitale Zellen in der Lage sind, den Farbstoff auszuschließen und im lichtmikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen diese Barriere nicht mehr aufrecht erhalten; tote Zellen nehmen Trypanblau auf und sind tiefblau gefärbt.

20 µl einer Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau-Lösung gemischt etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zum Füllen der Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zelldichte berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Zahl der Großquadrate}) \times 2 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

2.6.2 Zellverdünnungs-Experimente und Positivkontrollen

Ein Tropfen der in PBS gelösten HT 29-Zellsuspension wurde auf einer Petrischale, die mit Fetalem Kälberserum beschichtet war, um Adhäsionen der Zellen zu vermeiden, ausgestrichen. Auf diese Art und Weise waren lichtmikroskopisch (40 x Objektiv) einzelne Zellen identifizierbar. Unter dem Mikroskop konnten so mit Hilfe einer sterilen 1 µl Pipette einzelne Zellen angesaugt werden und jeweils 5 bzw. 10 einzelne HT 29-Zellen in zentralvenös abgenommene Vollblutproben gesunder Patienten transferiert werden.

Unter Verwendung einer geeigneten Verdünnungsreihe wurde ebenso Vollblut gesunder Patienten mit 100 und 1000 HT 29-Zellen beimpft. Auf diese Weise war es uns gelungen, Spiking-Proben herzustellen, deren Gehalt an Tumorzellen (5, 10, 100 oder 1000 Zellen) bekannt war. Mit Hilfe dieser Proben konnten wir die Sensitivität der eingesetzten RT-PCR testen (Abbildung 6).

Material und Methoden

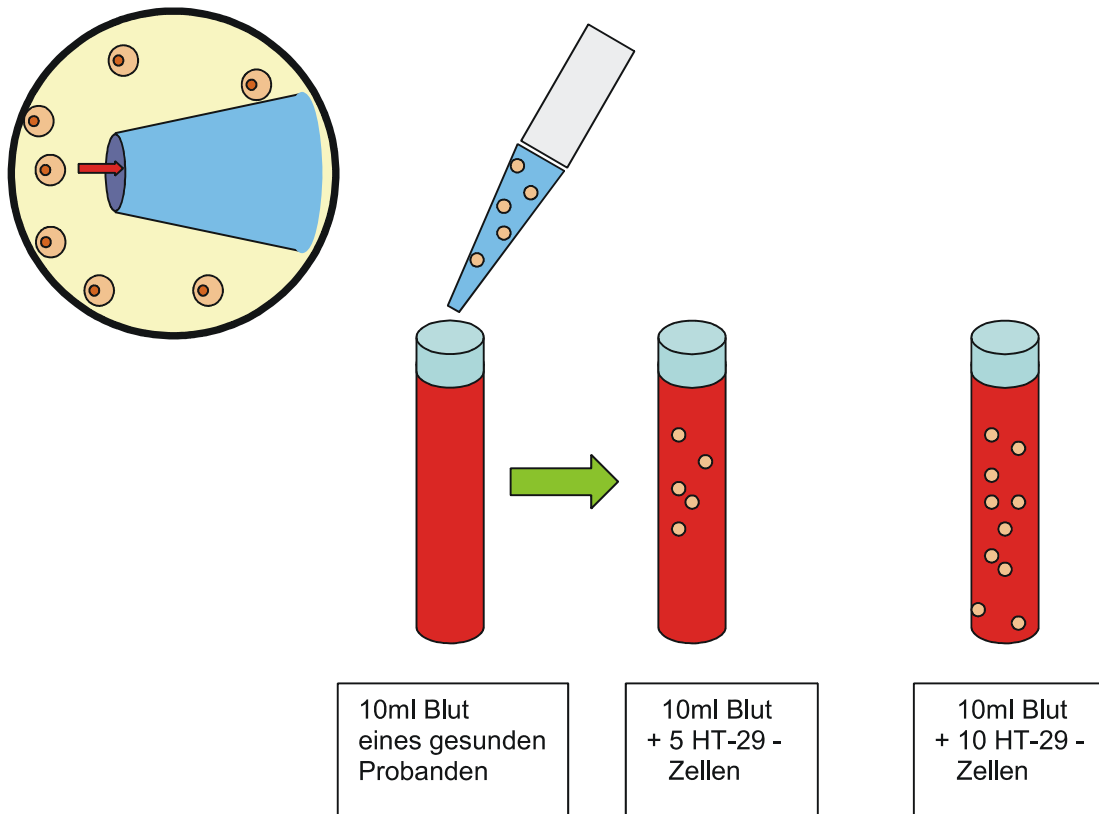


Abbildung 6: Zellverdünnungs-Experimente (Spiking)

Die restlichen HT 29-Zellen wurden nicht mit Vollblut versetzt, sondern in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml PBS direkt der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese zugeführt. In meiner Arbeit stand die RNA aus den Positivkontrollen mit unterschiedlichen Tumorzellanteilen bereits fertig isoliert zur Verfügung, so dass von mir selbst noch die cDNA-Synthese vorgenommen wurde. Die HT 29-cDNA wurde dann jeweils als Positivkontrolle bei allen RT-PCR-Läufen mitgeführt.

2.7 Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des SPSS Softwarepaketes, Version 11.0 (SPSS, Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Der Vergleich zwischen den Parametern der Patienten und dem Nachweis disseminierter Tumorzellen wurde unter Zuhilfenahme des Exakten Tests nach Fisher (2-seitig), des

Material und Methoden

Chi-Quadrat-Tests nach Pearson und des t-Tests für gepaarte Stichproben angestellt. Als Schwellenwert für das Bestehen statistischer Signifikanz wählten wir $p < 0.05$.

2.8 Patienteneinverständnis und Ethikvotum

Alle Patienten wurden an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt des Klinikums der Universität München operiert. Jeder Patient hatte im Vorfeld der Probenentnahme und –verarbeitung nach ausführlicher Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet. Die Untersuchung wurde von der zuständigen Ethikkommission der Universität München genehmigt.

Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1 Quantitative RT-PCR

Bevor es möglich war, die gesammelten Patientenproben zu analysieren, musste zunächst die RT-PCR selbst als Methode etabliert werden. Als vorrangiges Ziel galt es zunächst, eine sichere Unterscheidung zwischen einer Amplifikation genspezifischer Abschnitte (MAGE-A, Cyclophilin B) und unspezifischen Genprodukten wie den häufig auftretenden Primerdimeren treffen zu können. Hierzu bedienen wir uns der Schmelzkurvenanalyse, in der bei für den jeweiligen Genabschnitt typischen Schmelztemperaturen sich der Fluoreszenzfarbstoff wieder aus der DNA löst (siehe Abschnitt 2.5). Auf diese Art und Weise sind in der graphischen Darstellung spezifische Peaks auszumachen. Abbildung 7 zeigt den Vergleich der Schmelzkurven einer MAGE-A-Positivkontrolle aus HT 29-Zellen (blau) und MAGE-A-negativen Wasserprobe (grün), in der sich lediglich unspezifische Primer-Dimere gebildet haben, jedoch keinerlei MAGE-A-spezifische Genprodukte.

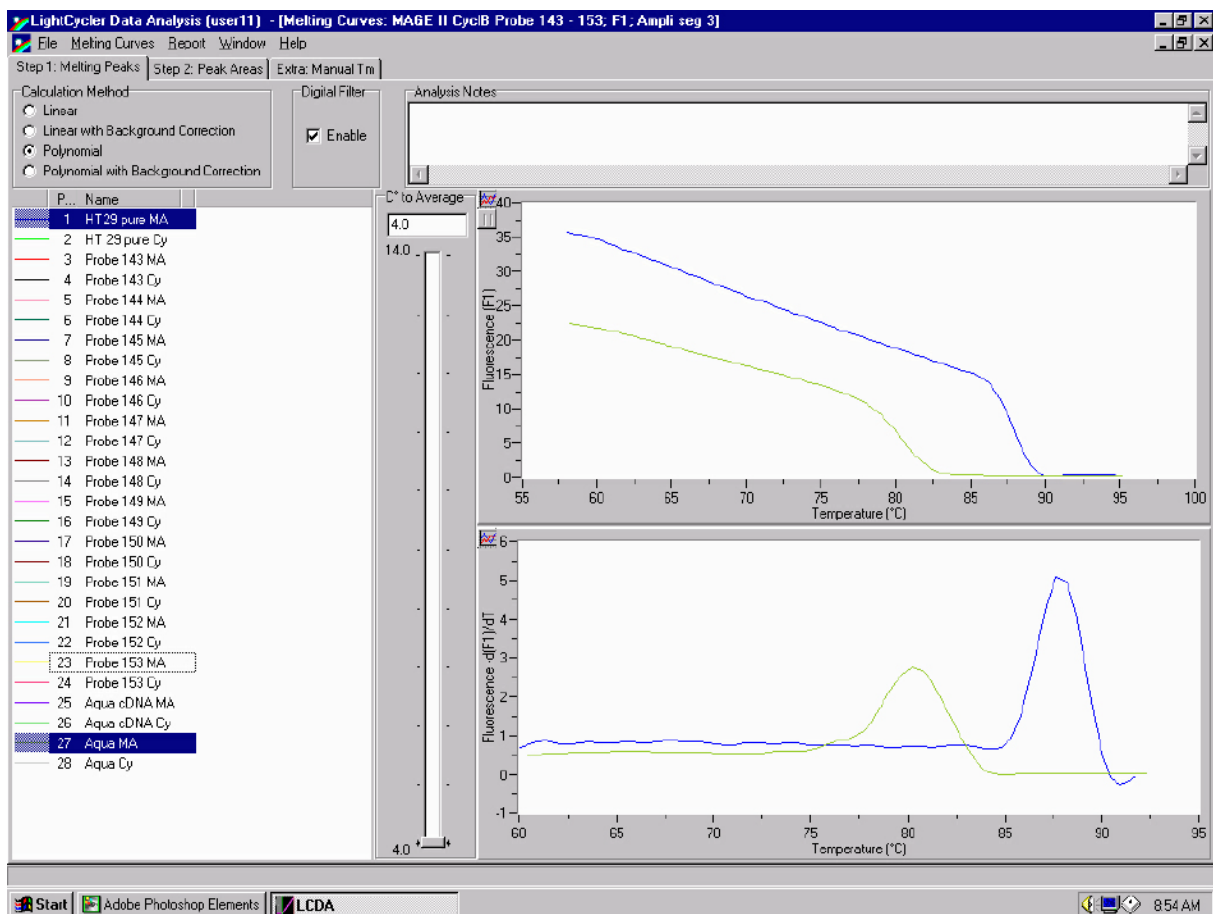


Abbildung 7: Schmelzkurvenanalyse einer Positivkontrolle (HT 29, blau) und einer Negativkontrolle (Wasser, grün)

Ergebnisse

Des Weiteren ermöglicht die Schmelzkurvenanalyse auch die Unterscheidung der Amplifikation mehrerer spezifischer Genprodukte untereinander. Abbildung 8 veranschaulicht die Differenzierung des Housekeeping-Genes Cyclophilin B (grün) und des Target-Genes MAGE-A (blau) nach demselben Prinzip.

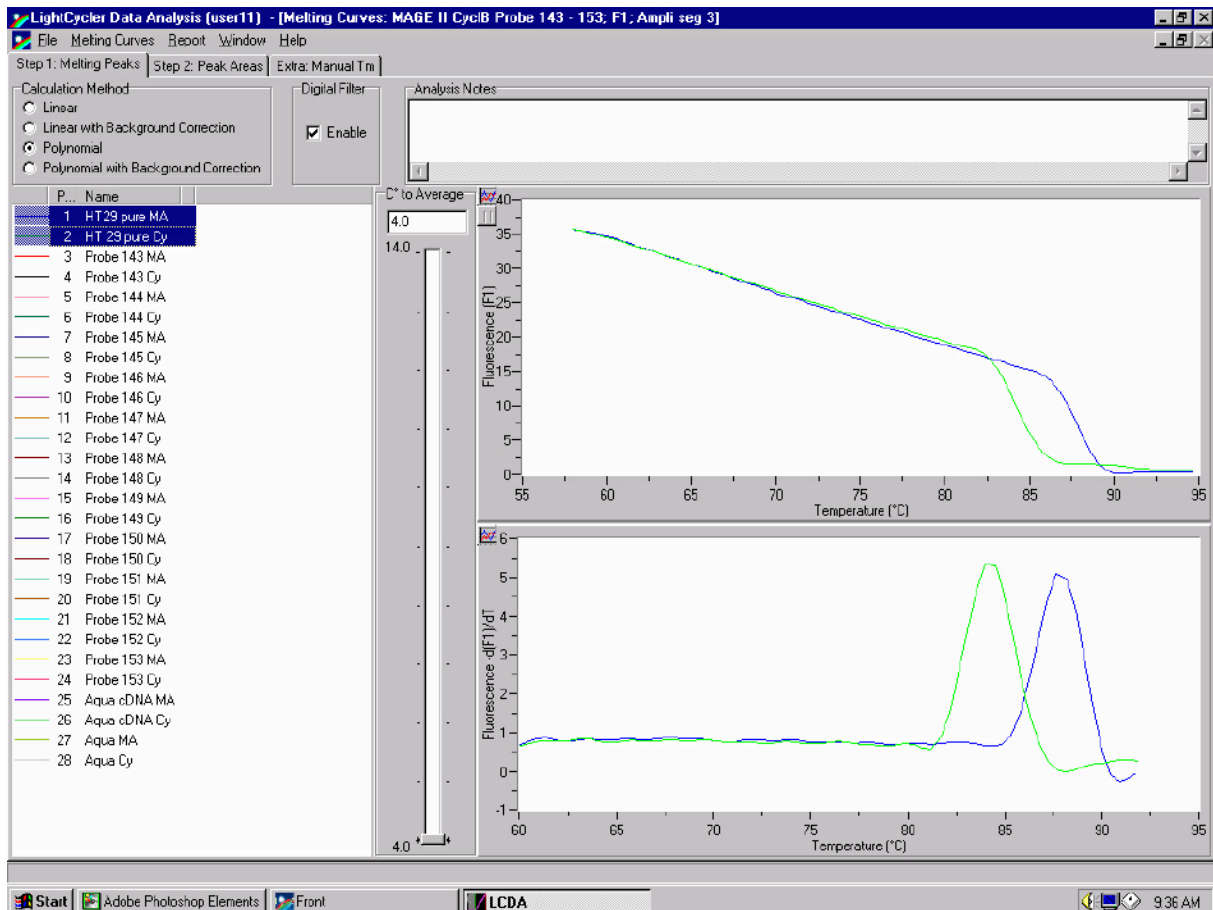


Abbildung 8: Schmelzkurvenanalyse nach Amplifikation von Cyclophilin B (grün) und MAGE-A (blau)

Im Folgenden galt es nun, eine sichere Differenzierung zwischen positivem und negativem Nachweis einzelner Tumorzellen zu ermöglichen. Hierbei zeigte die Analyse der typischerweise exponentiell verlaufenden RT-PCR-Kurven, dass sich in den Negativkontrollen nach dem Ablauf von durchschnittlich 38 Zyklen gehäuft Primer-Dimere und andere unspezifische Produkte bildeten. Somit waren Signale, die erst nach Ablauf von 38 Amplifikationszyklen exponentiell anstiegen, als nicht spezifisch und somit negativ zu werten. Bei der Untersuchung der Positivkontrollen (cDNA der Kolonkarzinom-Zelllinie HT

Ergebnisse

29) ermittelten wir in Abhängigkeit von der eingesetzten cDNA-Menge einen exponentiellen Anstieg zwischen 19 und 35 Zyklen, wobei bei einzelnen Proben auch ein Anstieg bei rund 37 Zyklen definiert werden konnte (siehe Abbildungen 9 und 10). Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse konnte neben dem parallelen Auftreten von unspezifischen Komponenten ein eindeutig auf das Vorhandensein MAGE-A-spezifischer Genprodukte zurückzuführender Peak identifiziert werden (Abb. 10). Dies ist wohl in erster Linie durch die niedrige und auch zum Teil stark variable Genexpression zu begründen.

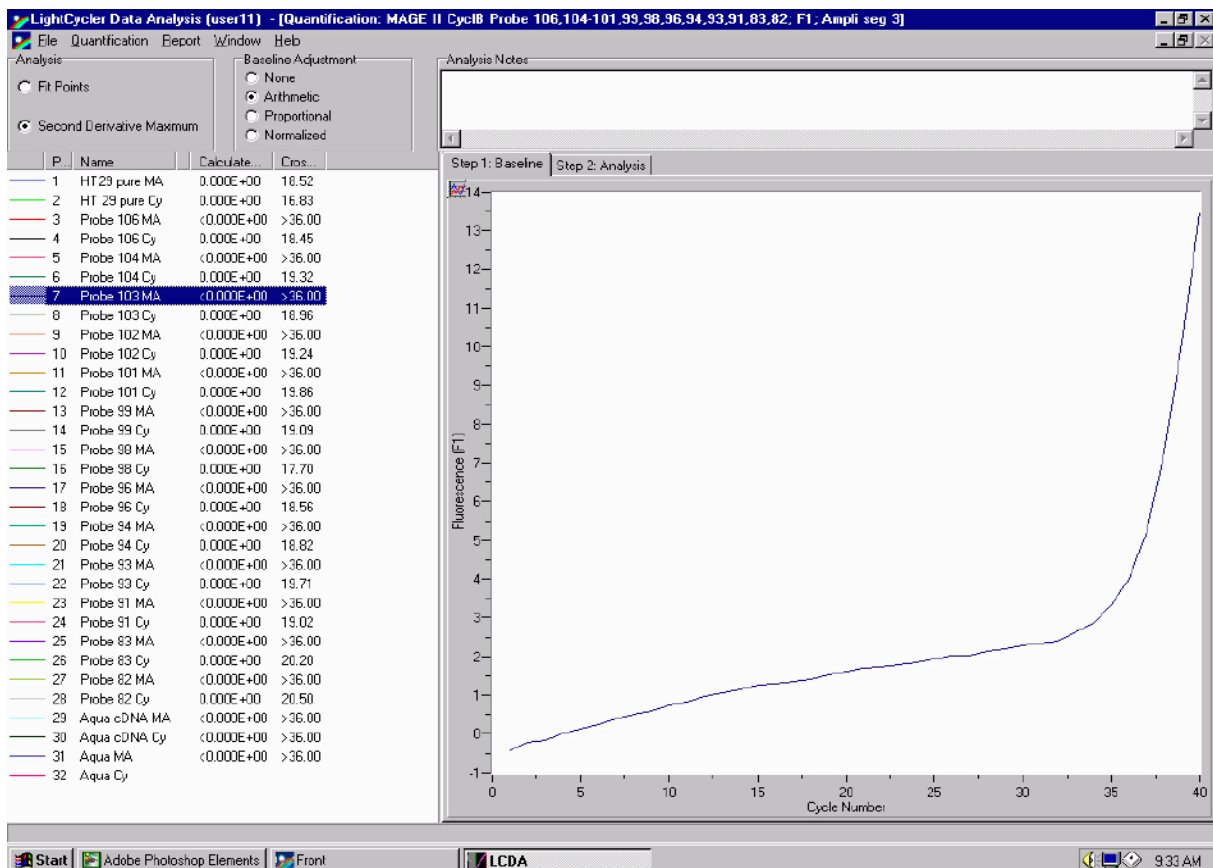


Abbildung 9: Quantifizierung der Probe mit Amplifikationsanstieg bei 37 Zyklen

Ergebnisse

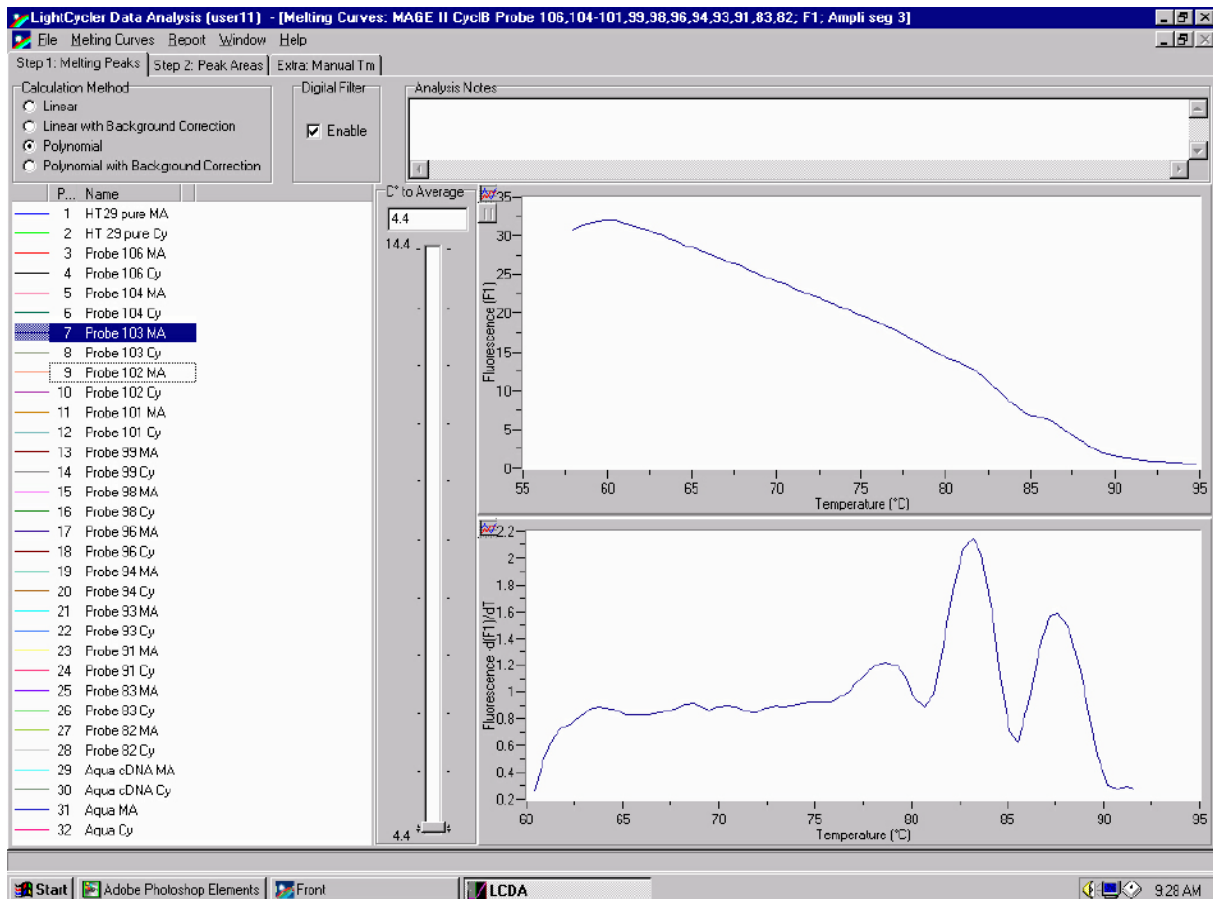


Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse der Probe mit Amplifikationsanstieg bei 37 Zyklen

Aufgrund dieser Resultate ergab sich als Schwellenwert zur Differenzierung positiver und negativer Probenergebnisse der Ablauf von 38 Zyklen.

Die weitere Evaluation der Methodik lieferte sowohl hinsichtlich Sensitivität als auch Spezifität hervorragende Resultate. Zur Überprüfung der Sensitivität führten wir, wie im Teil „Material und Methoden“ bereits beschrieben, Zellverdünnungs-Experimente durch, bei denen jeweils 1000, 100, 10 und 5 kultivierte HT 29-Zellen in 10 ml Vollblut von gesunden Kontrollpatienten pipettiert wurden (Abbildung 11). Alle eingesetzten Proben wurden als MAGE-A-positiv erkannt, gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Proben, die eine höhere Anzahl an HT 29-Zellen enthielten, früher im Verlauf der PCR erkannt wurden. Der Amplifikationsanstieg der Probe mit 1000 HT 29-Zellen lag bei 27 Zyklen, die der Proben mit 100 bzw. 10 HT 29-Zellen lagen bei 32 bzw. 34 Zyklen. Auch die Probe mit 5 HT 29-Zellen mit einem Amplifikationsanstieg bei 33 Zyklen konnte mit Hilfe des Nachweises spezifischer

Ergebnisse

MAGE-A-Genprodukte als positiv identifiziert wurden, während bei der Negativkontrolle lediglich unspezifische Primer-Dimere nachgewiesen werden konnten. Das Housekeeping-Gen Cyclophilin B war in allen Proben übereinstimmend nach 19 bis 21 Zyklen nachweisbar gewesen.

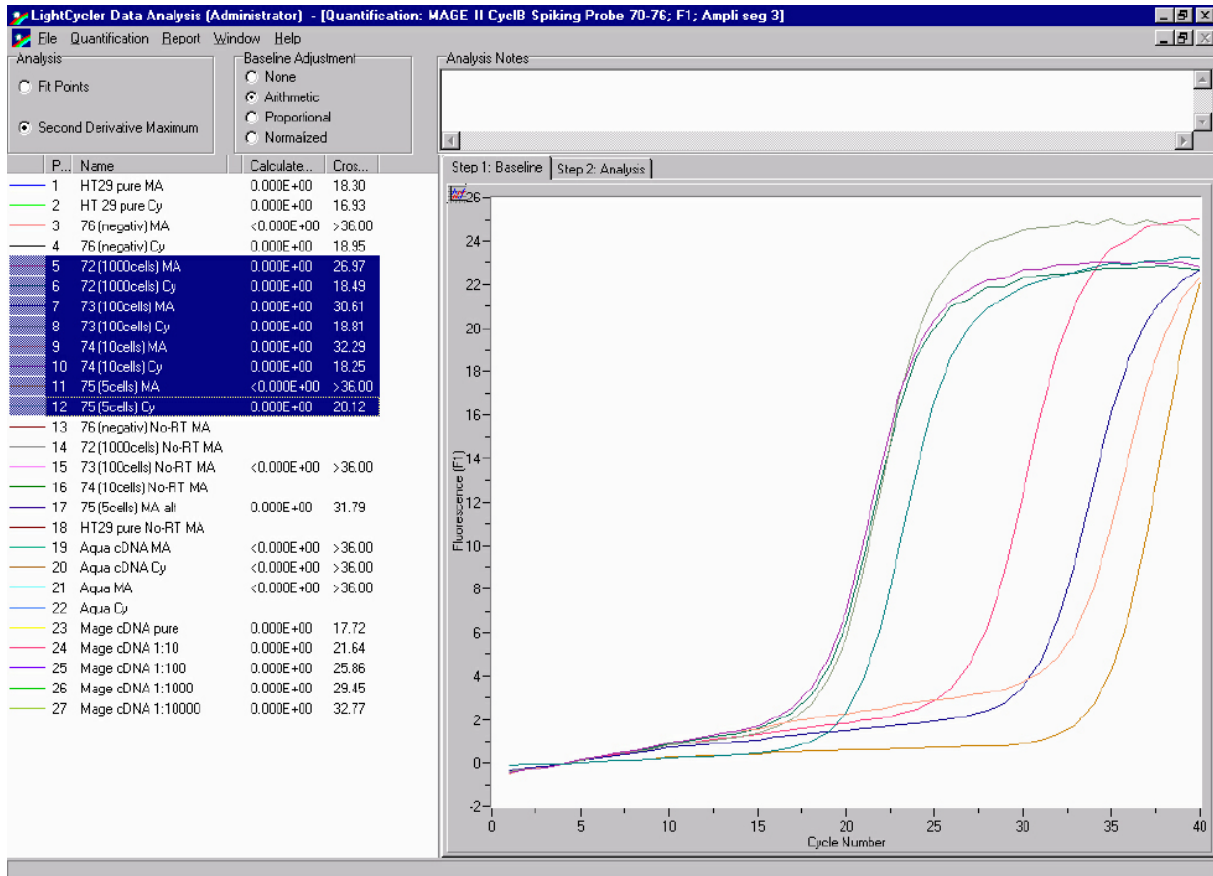


Abbildung 11: Quantifizierungs-Ergebnisse der Zellverdünnungs-Experimente mit 1000, 100, 10 und 5 Zellen

Nachdem die Wiederholung dieser Experimente zu vergleichbaren Resultaten geführt hat und somit alle produzierten Positivkontrollen auch als positiv identifiziert werden konnten, kann die Sensitivität der Methode hinsichtlich der Spiking-Experimente mit 100% beziffert werden.

Zur Evaluation der Spezifität wurde Vollblut von 14 gesunden Patienten überprüft, sämtliche Proben wurden nach den bereits dargelegten Kriterien korrekt als negativ erkannt (Abbildung 12). Die mitgeführte Wasserprobe blieb komplett negativ. Das Housekeeping-Gen wurde in einem Bereich zwischen 18 und 20 Zyklen positiv, der entsprechende Median beträgt 19,2 Zyklen. Eine typische Darstellung der so erhaltenen Ergebnisse zeigt Abbildung 12.

Ergebnisse

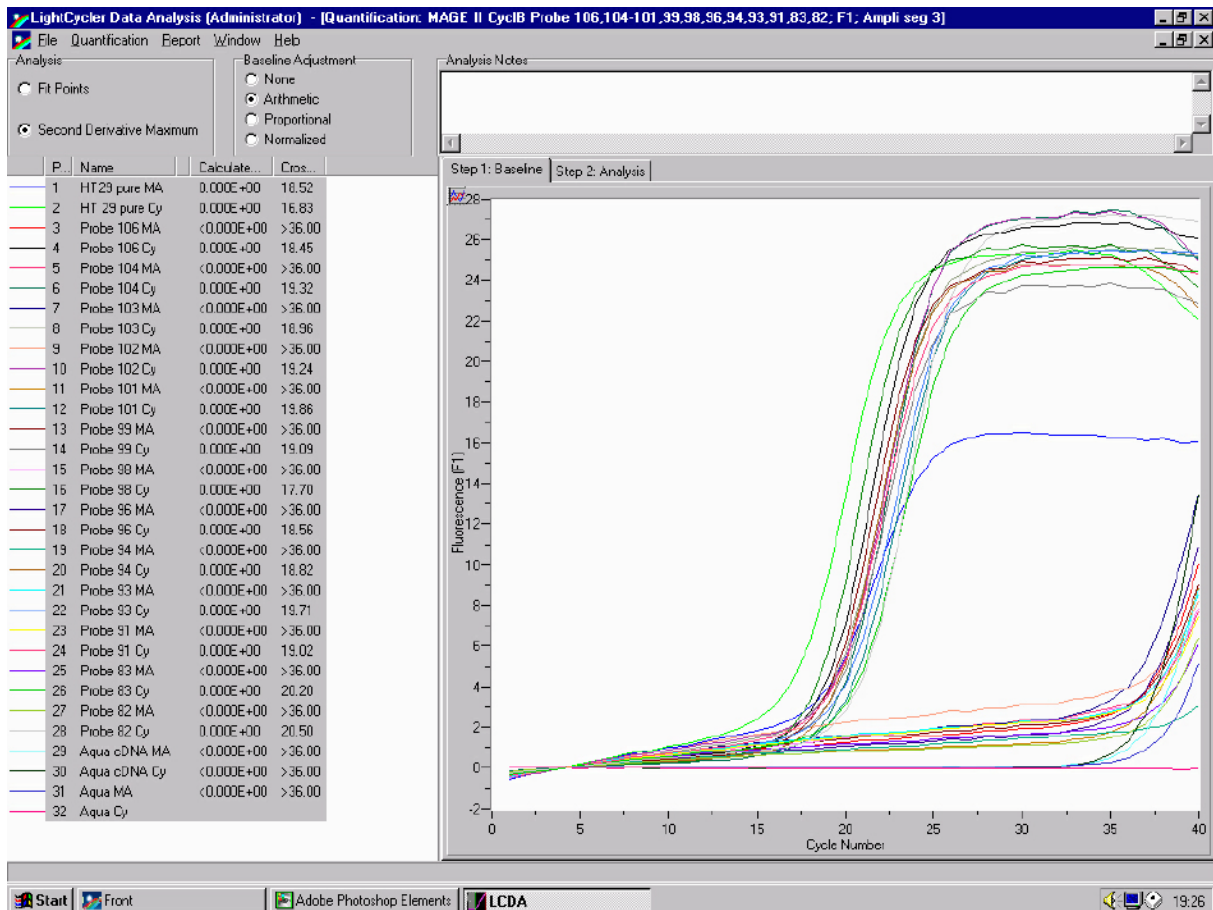


Abbildung 12: Quantifizierungs-Ergebnisse der Negativkontrollen

Nachdem auch alle 14 eingesetzten Vollblutproben von gesunden Patienten ohne maligne Grunderkrankung korrekt als negative Proben identifiziert wurden, konnten wir auch die Spezifität der verwendeten Methode als 100% bestimmen.

Ergebnisse

3.2 Klinische Parameter

3.2.1 Gesamtstatistik

Insgesamt konnten wir geeignete zentralvenöse prä- und postoperative Blutprobenpaare von 22 Patienten gewinnen, zudem wurde bei 19 der 22 Patienten intraoperativ eine Peritoneallavage durchgeführt; die so erhaltene Spülflüssigkeit haben wir ebenfalls mit den bereits dargestellten Aufarbeitungsmethoden auf das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen untersucht.

Von den 22 präoperativen Vollblutproben konnten in 10 Proben Tumorzellen nachgewiesen werden, was einem Prozentsatz von 45,5 % entspricht. Die Umschlagpunkte (Crossing Points) dieser positiven Proben lagen zwischen 32 und 37 Zyklen, im Durchschnitt bei 36,4 Zyklen. Betrachtet man hingegen die postoperativ entnommenen Proben, so lieferte bei 13 Patienten die RT-PCR ein positives Nachweisresultat, was einem Anteil von 59,1 % entspricht. Die Umschlagpunkte der exponentiellen Amplifikationskurven lagen in einem Bereich zwischen 34 und 37 Umläufen, der Median betrug 36,5 Zyklen.

In 5 der 19 gewonnenen Peritoneallavagen gelang ein Nachweis von MAGE-A-Genen, somit enthielten 26,3 % der untersuchten Proben disseminierte Tumorzellen. Durchschnittlich lag der sichtbare Amplifikationsanstieg dieser Reaktionen bei 33,8 Zyklen mit einem Minimum von 22 und einem Maximum von 37 Umläufen.

Bei allen 22 Patienten erfolgte nach durchschnittlich 19,8 Zyklen ein positiver Nachweis des Housekeeping-Genes Cyclophilin B, der früheste Crossing Point lag bei 17, der späteste bei 33 Zyklen.

Die Abbildungen 13 und 14 illustrieren die typischen positiven Nachweisreaktionen aus Vollblut oder Peritoneallavage.

Ergebnisse

Abbildung 14 zeigt den repräsentativen Verlauf der Schmelzkurve einer positiven Nachweisreaktion von MAGE-A-Genen. Auffällig ist der zweigipflige Verlauf der Kurve; der Vergleich mit den zur Evaluation der Methodik angefertigten Schmelzkurven zeigt, dass es sich angesichts der jeweiligen Schmelztemperaturen beim linken Gipfel um unspezifische Primer-Dimere handelt, der rechte Gipfel jedoch die Amplifikation von Genen der MAGE-A-Familie repräsentiert.

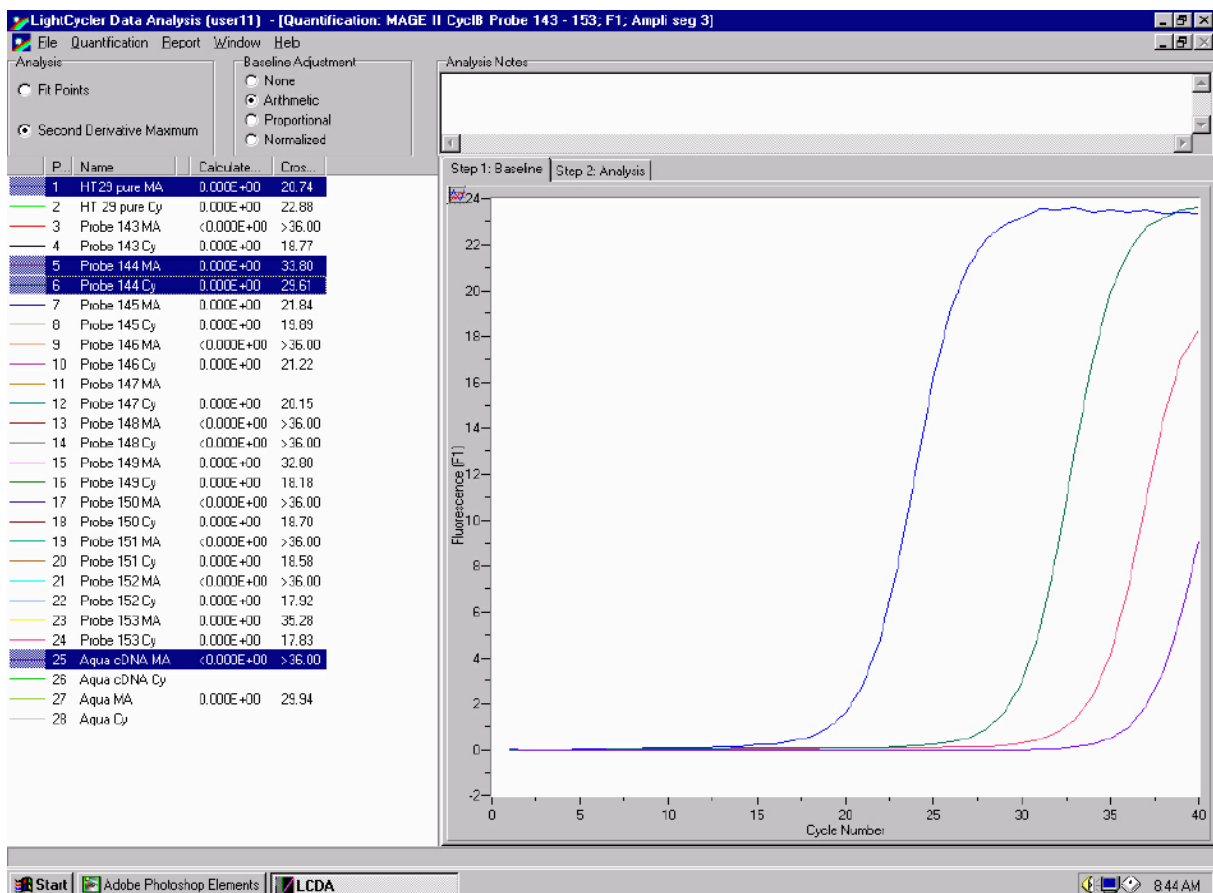


Abbildung 13: Neben der Positivkontrolle (blau) und einer Negativkontrolle (violett) sind die exponentiellen Kurvenverläufe von Housekeeping- (grün) und Target-Gen (pink) dargestellt.

Ergebnisse

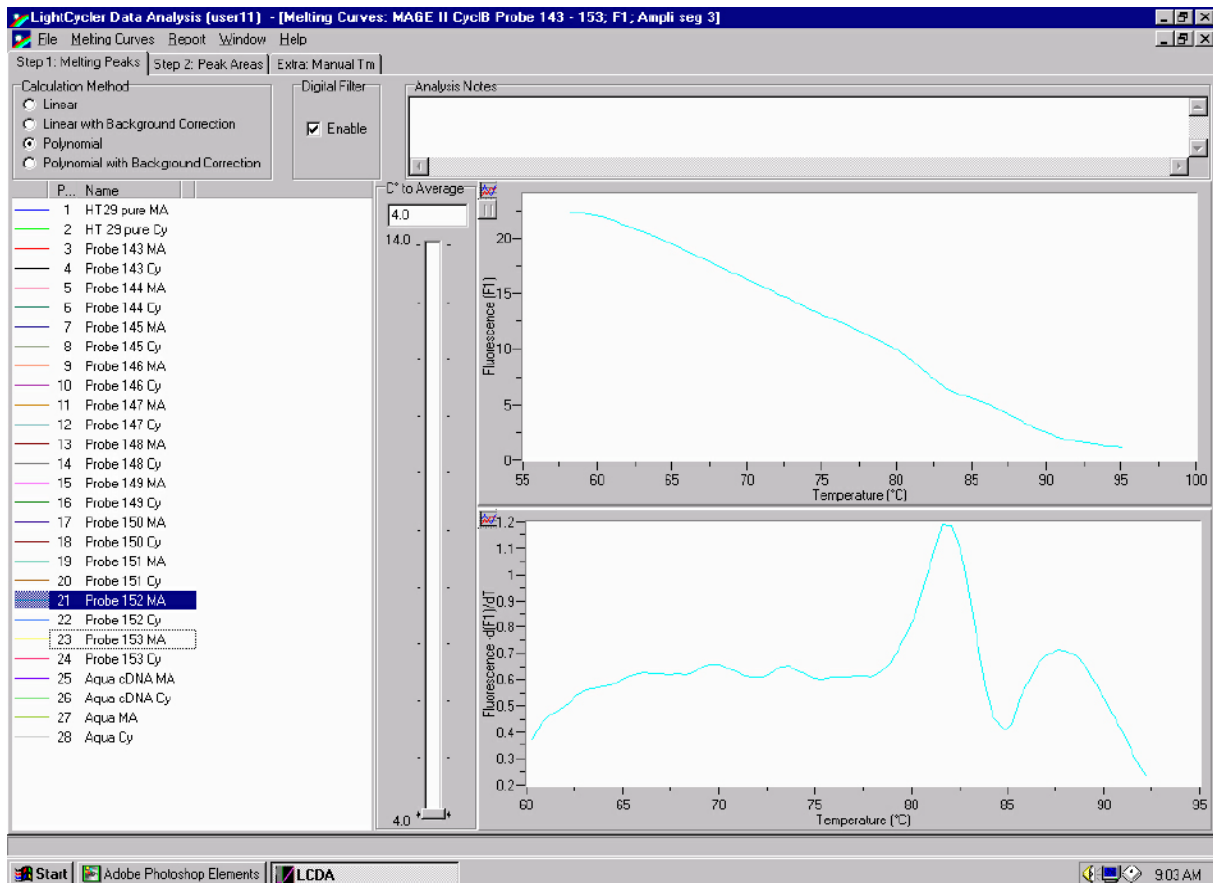


Abbildung 14: Repräsentativer Verlauf der Schmelzkurve einer positiven Nachweisreaktion von MAGE-A-Genen. Auffällig ist der zweigipflige Verlauf der Kurve; der Vergleich mit den zur Evaluation der Methodik angefertigten Schmelzkurven zeigt, dass es sich angesichts der jeweiligen Schmelztemperaturen beim linken Gipfel um unspezifische Primer-Dimere handelt, der rechte Gipfel jedoch die Amplifikation von Genen der MAGE-A-Familie repräsentiert.

Des Weiteren liefert die Tabelle 1 einen Überblick über das untersuchte Patientenkollektiv. Die farbigen Markierungen heben MAGE-A-positive Ergebnisse hervor, wobei die Farbe rot entsprechende präoperative, gelb postoperative zentralvenöse Vollblutproben und grün Peritoneallavagen mit disseminierten Tumorzellen kennzeichnet.

Ergebnisse

Tabelle 1: Vergleich der MAGE-A-RT-PCR-Ergebnisse mit den Patientendaten

Nr.	Prä/Post/Peri	Amplifikationsanstieg (Zyklen) MAGE-A	pT	pN	M	G	Tumortyp	Alter (Jahre)	Geschlecht
01	Prä (-)	> 38	pT4	pN1	M1	G3	Magen	66	weiblich
	Post (+)	34							
	Peri (+)	22							
02	Prä (-)	> 38	pT3	pN2	M1	G2	Kolorektal	65	weiblich
	Post (-)	> 38							
	Peri (-)	> 38							
03	Prä (-)	> 38	pT3	pN2	M1	G2	Kolorektal	57	männlich
	Post (-)	> 38							
	Peri (-)	> 38							
04	Prä (+)	37	pT2	pN1	M1	G3	Magen	65	weiblich
	Post (-)	> 38							
	Peri (-)	> 38							
05	Prä (+)	37	pT3	pN0	M1	G2	Kolorektal	72	männlich
	Post (+)	37							
	Peri (+)	37							
06	Prä (+)	37	pT3	pN2	M1	G3	Kolorektal	68	männlich
	Post (+)	37							
	Peri (+)	37							
07	Prä (+)	37	pT2	pN0	M0	G2	Kolorektal	79	männlich
	Post (+)	35							
08	Prä (+)	33	pT2	pN0	M0	G3	Kolorektal	82	weiblich
	Post (+)	36							
	Peri (-)	> 38							
09	Prä (+)	36	pT2	pN2	M0	G3	Magen	73	weiblich
	Post (-)	> 38							
	Peri (-)	> 38							
10	Prä (+)	36	pT3	pN0	M0	G2	Kolorektal	81	weiblich
	Post (+)	37							
	Peri (-)	> 38							
11	Prä (-)	> 38	pT3	pN0	M0	G3	Kolorektal	73	männlich
	Post (-)	> 38							
	Peri (-)	> 38							
12	Prä (-)	> 38	pT1	pN0	M0	G2	Kolorektal	66	weiblich
	Post (+)	37							

Ergebnisse

Nr.	Prä/Post/Peri	Amplifikationsanstieg (Zyklen) MAGE-A	pT	pN	M	G	Tumortyp	Alter (Jahre)	Geschlecht
13	Prä (-)	> 38	pT1	pN0	M0	G2	Kolorektal	77	männlich
	Post (-)	> 38							
	Peri (-)	> 38							
14	Prä (-)	> 38	pT3	pN0	M0	G2	Kolorektal	67	männlich
	Post (+)	37							
	Peri (-)	> 38							
15	Prä (-)	> 38	pT3	pN0	M0	G3	Ösophagus	50	männlich
	Post (-)	> 38							
	Peri (-)	> 38							
16	Prä (+)	37	pT3	pN1	M0	G2	Kolorektal	77	weiblich
	Post (+)	37							
	Peri (-)	> 38							
17	Prä (+)	37	pT3	pN0	M0	G1	Kolorektal	63	männlich
	Post (+)	37							
	Peri (-)	> 38							
18	Prä (+)	37	pT1	pN0	M0	G3	Magen	55	männlich
	Post (+)	37							
	Peri (-)	> 38							
19	Prä (-)	> 38	pT4	pN1	M0	G3	Magen	64	männlich
	Post (-)	> 38							
	Peri (-)	> 38							
20	Prä (-)	> 38	pT3	pN0	M0	G3	Kolorektal	52	weiblich
	Post (+)	37							
	Peri (-)	> 38							
21	Prä (-)	> 38	pT1	pN0	M0	G1	Magen	72	männlich
	Post (+)	36							
	Peri (+)	36							
22	Prä (-)	> 38	pT1	pN1	M0	G3	Magen	73	männlich
	Post (-)	> 38							
	Peri (+)	37							

Prä (+) präoperative Probe positiv

Prä (-) präoperative Probe negativ

Post (+) postoperative Probe positiv

Post (-) postoperative Probe negativ

Peri (+) Peritoneallavage positiv

Peri (-) Peritoneallavage negativ

Ergebnisse

3.2.2 Abhängigkeit der Disseminierung von der Tumorausdehnung (pT-Stadium)

Zunächst untersuchten wir, ob der Nachweis disseminierter Tumorzellen von der Ausdehnung des Primärtumors abhängig ist. Von den 22 Patienten, von denen Vollblutproben analysiert wurden, wiesen 9 Patienten einen Primärtumor im Stadium pT1 oder pT2 auf, während sich die übrigen 13 Patienten bereits in fortgeschritteneren Tumorstadien (pT3 oder pT4) befanden.

Präoperativ konnte bei 5 der 9 Patienten mit geringerer Tumorausdehnung eine Disseminierung nachgewiesen werden (55,6 %), während hingegen in späteren Tumorstadien in nur 38,5 % (5 von 13 Patienten) die RT-PCR ein positives Resultat hervorbrachte; der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,67$, Exakter Test nach Fisher). In der pT1/pT2-Gruppe lagen die Crossing Points bei durchschnittlich 36 Zyklen zwischen 33 und 37 Umläufen, die Proben der pT3/pT4-Gruppe wurden erst etwas später nach 36,6 Zyklen positiv.

Postoperativ konnte in den früheren Tumorstadien keine weitere Steigerung der Tumorzell-disseminierung nachgewiesen werden, es blieb bei einer Rate von 55,6 % (5 von 9 Patienten), die Crossing Points waren mit durchschnittlich 36,2 Zyklen (zwischen 35 und 37 Zyklen) nur leicht verändert. Nach der Operation konnten jedoch bei 8 von 13 Patienten in höherem pT-Stadium (61,5 %) Gene der MAGE-A-Familie gefunden werden, die Crossing Points blieben bei 36,6 Zyklen. Der Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen wies jedoch keine statistische Signifikanz auf ($p=1,0$, Exakter Test nach Fisher).

7 der 19 Peritoneallavagen wurden bei Patienten im Stadium pT1 oder pT2 durchgeführt, davon fielen 2 positiv aus, was einem Prozentsatz von 28,6 % entspricht. Der Umschlag der PCR-Kurve erfolgte nach 36 bzw. 37 Zyklen. Nur 3 der restlichen 12 Lavagen (25,0 %) von Patienten im Tumorstadium pT3 oder pT4 enthielten Tumorzellen, die frühestens nach 22, spätestens nach 37 Umläufen (Median 32 Zyklen) nachweisbar waren ($p=1,0$, Exakter Test nach Fisher).

Ergebnisse

3.2.3 Abhängigkeit der Disseminierung von der Lymphknotenbeteiligung (pN-Stadium)

Um die Abhängigkeit des Disseminierungsnachweises vom Ausmaß der Lymphknotenbeteiligung analysieren zu können, unterteilten wir unser Patientenkollektiv in eine Gruppe ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) und in eine Gruppe mit Lymphknotenmetastasen, die die Stadien pN1 und pN2 enthielt. 13 Patienten erfüllten das Kriterium pN0, während bei 9 Patienten eine Lymphknotenbeteiligung vorlag.

6 der 13 präoperativ entnommenen Vollblutproben der Patienten des Stadiums pN0 enthielten disseminierte Tumorzellen; dies entspricht einem Anteil von 46,2 %. Die durchgeführten Nachweisreaktionen wurden nach 33 bis 37 Umläufen, im Mittel nach 36,2 Zyklen positiv. Von den 9 Patienten mit nachgewiesener Lymphknotenbeteiligung waren 4 (44,4 %) präoperativ positiv und somit nicht signifikant häufiger ($p=1,0$, Exakter Test nach Fisher). Die Umschlagpunkte dieser Proben lagen zwischen 36 und 37 Zyklen, durchschnittlich bei 36,8 Amplifikationszyklen.

Postoperativ hingegen war vor allem eine Steigerung der Nachweisquote bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen zu erkennen. Hier waren 10 der 13 Patienten MAGE-A-positiv, was einem Anteil von 76,9 % gleichkommt. Der sichtbare Amplifikationsanstieg lag in einem Intervall zwischen 35 und 37 Zyklen (Median 36,6 Zyklen). Von den Patienten der pN1/pN2-Gruppe waren lediglich 3 der 9 postoperativen Proben (33,3 %) positiv. Die Umschlagpunkte dieser Analysen waren bei 36 bzw. 37 Umläufen ablesbar, im Durchschnitt bei 36,7 Zyklen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,08$, Exakter Test nach Fisher).

Bei 11 Patienten im Stadium pN0 wurde eine Peritoneallavage durchgeführt, zusätzlich konnten wir geeignete Spüllösungen bei 8 Patienten mit Lymphknotenmetastasen gewinnen. Bei 2 der 11 pN0-Patienten (18,2 %) enthielt die Peritoneallavage MAGE-A-positive Zellen, was in der PCR nach 36 bzw. 37 Zyklen gezeigt werden konnte. Von den 8 Proben von Personen mit Lymphknotenbeteiligung konnte

Ergebnisse

bei 3 Patienten eine Disseminierung aufgezeigt werden; dies entspricht einem Anteil von 37,5 %. Der Unterschied der Nachweishäufigkeit zwischen der pN0-Gruppe und der pN1/pN2-Gruppe war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,60$, Exakter Test nach Fisher). Der positive Nachweis konnte nach durchschnittlich 32 Zyklen erbracht werden, wobei der früheste sichtbare Amplifikationsanstieg bei 22, der späteste bei 37 Zyklen lag.

3.2.4 Abhängigkeit der Disseminierung von Fernmetastasen (M-Stadium)

Um diesen Parameter analysieren zu können, bildeten wir zwei Patientengruppen: bei 16 Patienten konnten bisher keinerlei Fernmetastasen gefunden werden (Stadium M0), bei 6 Patienten waren bereits Filiae dokumentiert (Stadium M1). Die Metastasen waren bereits zum Operationszeitpunkt bekannt und befanden sich vor allem in Lunge und Leber. Bei diesen Patienten wurde die Operation in palliativer Intention zur lokalen Tumorkontrolle vorgenommen.

Im Rahmen der präoperativen Untersuchungen waren 7 der 16 Vollblutproben von Patienten im Stadium M0 MAGE-A-positiv; dies kommt einem Anteil von 43,8 % gleich. Die sichtbaren Amplifikationsanstiege dieser RT-PCR-Quantifizierungskurven bewegten sich zwischen 33 und 37 Zyklen (Mittelwert 36,1 Zyklen). Betrachtet man die präoperativen Proben der Patienten im Stadium M1, so fielen 50 % der Analysen (3 von 6) nach jeweils 37 Amplifikationszyklen positiv aus. Der Unterschied der präoperativen Nachweishäufigkeit von MAGE-A-positiven Zellen beim Vergleich von M0- und M1-Gruppe war somit nicht signifikant ($p=1,0$, Exakter Test nach Fisher).

Postoperativ zeigt sich eine Steigerung des Anteils MAGE-A-positiver Resultate im Patientenkollektiv ohne Fernmetastasen. In 10 von 16 untersuchten Fällen konnten Tumorzellen nachgewiesen werden; dies bedeutet eine Steigerung der Quote auf 62,5 %. Die Bandbreite der sichtbaren Amplifikationsanstiege der positiven Proben rangierte zwischen 35 und 37 Zyklen, der statistische Mittelwert beträgt 36,6 Zyklen. Keine Änderung der Nachweisrate MAGE-A-positiver Zellen zeigte sich

Ergebnisse

bei der Analyse der postoperativ abgenommenen Blutproben bei Patienten mit bereits vorbekannten Fernmetastasen. Hier fielen 3 der 6 Proben positiv aus (50 %), die Umschlagpunkte der RT-PCR variierten zwischen 34 und 37 Zyklen, im Mittel fiel die Analyse nach 36 Zyklen positiv aus. Der Unterschied der postoperativen Nachweishäufigkeit MAGE-A-positiver Zellen zwischen Patienten mit und ohne Fernmetastasen war nicht statistisch signifikant ($p=0,66$, Exakter Test nach Fisher).

Bei allen 6 Patienten im Stadium M1 wurde intraoperativ eine Peritoneallavage durchgeführt. Bei 13 Patienten ohne Fernmetastasen konnte eine geeignete Spülflüssigkeit gewonnen werden. In der Gruppe der M0-Patienten fiel die Nachweisreaktion in 15,4 % der Fälle (2 von 13 Proben) positiv aus. Diese Ergebnisse waren nach 36 bzw. 37 Amplifikationszyklen ablesbar. In der Gruppe der Patienten mit bekannten Fernmetastasen waren hingegen in 3 der 6 Proben disseminierte Tumorzellen intraoperativ zu finden, was einer Quote von 50 % entspricht. Der Nachweis von Genen der MAGE-A-Familie gelang nach durchschnittlich 32 PCR-Zyklen, der früheste Umschlagpunkt lag bei 22, der späteste bei 37 Zyklen. Im Vergleich zu den Patienten ohne Fernmetastasen konnten aber MAGE-A- positive Zellen nicht signifikant häufiger nachgewiesen werden ($p=0,26$, Exakter Test nach Fisher).

3.2.5 Abhängigkeit der Disseminierung vom Grading (G-Stadium)

In Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der zugrunde liegenden Primärtumoren unterteilten wir das Patientenkollektiv in eine Gruppe mit gut bzw. mäßig differenzierten Tumoren (G1 bzw. G2) und in eine Gruppe mit wenig differenzierten Primärtumoren (G3). Auf jede der beiden Gruppen entfielen jeweils gleichermaßen 11 Patienten.

In der Aufarbeitung der präoperativen Vollblutproben ergab sich kein Unterschied hinsichtlich des Nachweises MAGE-A-positiver Zellen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Primärtumors ($p=1,0$, Exakter Test nach Fisher). Bei 5 von 11 Patienten in der G1/G2-Gruppe (45,5 %) konnte der Nachweis einer Disseminierung erbracht werden. Der sichtbare Amplifikationsanstieg lag in einem

Ergebnisse

einheitlichen Bereich zwischen 36 und 37 Zyklen (Durchschnitt 36,8 Zyklen). Auch bei 5 von 11 Patienten mit gering differenzierten Primärtumoren (45,5 %) gelang ein Nachweis von Tumorzellen in der präoperativen Probe. Die Umschlagpunkte der PCR-Reaktion bewegten sich in einer Bandbreite zwischen 33 und 37 Zyklen mit einem Mittelwert von 36 Umläufen.

Postoperativ hingegen war erneut eine Erhöhung des Anteils MAGE-A-positiver Vollblutproben, in diesem Fall in der Gruppe der Patienten, die an gut bis mäßig differenzierten Malignomen erkrankt waren, festzustellen. Bei 8 von 11 Patienten lieferte die RT-PCR ein positives Resultat; dies entspricht einer Quote von 72,7 %. Die Crossing Points der entsprechenden Quantifizierungskurven lagen zwischen 35 und 37 Umläufen (Durchschnitt 36,6 Zyklen). In der Gruppe von Patienten mit niedrig differenzierten Tumoren blieb die Anzahl der nachgewiesenen Disseminierungsfälle konstant bei 45,5 % (5 von 11 Patienten). Der Unterschied der postoperativen Nachweishäufigkeit MAGE-A positiver Zellen zwischen der G1/G2-Gruppe und der G3-Gruppe war nicht statistisch signifikant ($p=0,39$, Exakter Test nach Fisher). Die Umschlagpunkte dieser Reaktionen bewegten sich in einem Intervall zwischen 34 und 37 Umläufen, der Durchschnitt lag bei 36,2 Zyklen.

Eine Peritoneallavage konnten wir bei 8 Patienten mit Tumoren des Differenzierungsgrades G1 oder G2, zusätzlich bei 11 Patienten mit gering differenziertem Primärtumor (G3) durchführen. Insgesamt erhielten wir bei 2 der 8 Patienten aus der G1/G2-Gruppe ein positives RT-PCR-Ergebnis (25,0 %), das nach 36 bzw. 37 Zyklen erkennbar war. In 3 der 11 Lavageproben aus der G3-Gruppe waren MAGE-A-positive Zellen enthalten, dies entspricht einem Anteil von 27,3 %. Der Unterschied der Nachweishäufigkeit MAGE-A-positiver Zellen zwischen der G1/G2-Gruppe und der G3-Gruppe war nicht statistisch signifikant ($p=1,0$, Exakter Test nach Fisher). Die Umschlagpunkte der RT-PCR-Kurven lagen bei durchschnittlich 32 Zyklen (Minimum 22 Umläufe, Maximum 37 Umläufe).

Ergebnisse

3.2.6 Abhängigkeit der Disseminierung vom Tumortyp

Neben TNM-Stadium und Grading galt es, den Einfluß des zugrundeliegenden Tumortyps auf die Disseminierung von Tumorzellen genauer zu betrachten. Von unseren insgesamt 22 Patienten litten 14 an einem kolorektalen Karzinom, 7 Patienten waren an einem Karzinom des Magens erkrankt und bei einem Patienten war ein Ösophagus-Karzinom nachgewiesen worden. Da in diesem Fall nun eine Unterteilung des Patientenkollektives in drei statt (hinsichtlich der anderen Abhängigkeitsfaktoren bisher immer) zwei Gruppen vorgenommen werden musste, konnte kein p -Wert mittels des Exakten Tests nach Fisher (2-seitig) berechnet werden. Es wurde daher der Chi-Quadrat-Test nach Pearson verwendet.

In der präoperativen Analyse erhielten wir bei 7 der 14 Patienten mit kolorektalem Karzinom (50 %) ein positives Testergebnis. Die Crossing Points lagen bei durchschnittlich 36,3 Zyklen in einem Bereich zwischen 33 und 37 Zyklen. In der Gruppe der Magenkarzinom-Patienten konnte bei 3 von 7 Patienten (42,9 %) eine Disseminierung im Blut nachgewiesen werden. In der RT-PCR war ein entsprechendes Ergebnis jeweils nach 36 bzw. 37 Zyklen (durchschnittlich 36,7 Zyklen) ablesbar. Die präoperative Vollblutprobe des Ösophaguskarzinom-Patienten hingegen blieb negativ. Der Unterschied der präoperativen Disseminierungsrate in Abhängigkeit vom jeweiligen Tumortyp war statistisch nicht signifikant ($p=0,61$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson).

Postoperativ war eine Nachweisrate in der Gruppe der Patienten mit kolorektalem Karzinom von 71,4 % (10 von 14 Proben) erkennbar. Die Umschlagpunkte der Quantifizierungskurven lagen zwischen 35 und 37 Zyklen (Durchschnitt 36,7 Zyklen). Hingegen blieb der Anteil MAGE-A-positiver Proben postoperativ bei den Magenkarzinom-Patienten gleich bei 42,9 % (3 von 7 Patienten). Die Crossing Points bewegten sich zwischen 34 und 37 Amplifikationszyklen, im Mittel bei 35,7 Umläufen. Bei dem Patienten mit Ösophagus-Karzinom war auch in der postoperativen Analyse keine Disseminierung nachweisbar. Der

Ergebnisse

Unterschied der postoperativen Nachweishäufigkeit MAGE-A-positiver Zellen zwischen den verschiedenen Tumortypen war nicht statistisch signifikant ($p=0,21$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson).

Eine Peritoneallavage stand uns von 11 Patienten mit kolorektalem Karzinom, von 7 Magenkarzinom-Patienten und von einem Patienten mit Ösophagus-Karzinom zur Verfügung. 2 der 11 Proben aus der Gruppe der Kolorektalkarzinompatienten waren MAGE-A-positiv, was einem Prozentsatz von 18,2 % gleichkommt. Die entsprechenden Crossing Points waren nach übereinstimmend 37 Zyklen auszumachen. Hingegen waren bei 3 der 7 Magenkarzinom-Patienten disseminierte Tumorzellen in der Spülflüssigkeit nachweisbar (42,9 %), die Umschlagpunkte bewegten sich in einem Intervall zwischen 22 und 37 Zyklen bei einem Durchschnittswert von 31,7 Umläufen. Auch in der Peritoneallavage des Patienten, der an einem Ösophagus-Karzinom erkrankt war, konnten keine MAGE-A-positiven Zellen gefunden werden. Auch hier war der Unterschied der Nachweishäufigkeit MAGE-A positiver Zellen zwischen den verschiedenen Tumortypen nicht statistisch signifikant ($p=0,42$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson).

3.2.7 Abhängigkeit der Disseminierung vom Alter der Patienten

Der Altersmedian unseres Patientenkollektivs betrug 68 Jahre. Aus diesem Grund setzten wir die Grenze zwischen den beiden zu vergleichenden Gruppen bei 68 Lebensjahren an. Die 22 Patienten konnten zu gleichen Teilen in zwei Gruppen aufgeteilt werden: 11 Patienten, die jünger als 68 Jahre alt waren, und 11 Patienten, die 68 Jahre oder älter waren.

Präoperativ konnten in 27,3 % (3 von 11) der Proben jüngerer Patienten disseminierte Tumorzellen gefunden werden. Die Crossing Points dieser Proben lagen bei einheitlich 37 Zyklen. Im Gegensatz dazu fanden sich in der Gruppe der älteren Patienten bei 7 von 11 Patienten MAGE-A-positiv Zellen in der präoperativen Vollblutprobe (63,6 %). Die Umschlagpunkte in dieser Gruppe waren um den Wert von 36,1 Zyklen zwischen 33 und 37 Amplifikationszyklen verteilt. Der ermittelte Häufigkeitsunterschied

Ergebnisse

disseminierter Zellen zwischen den beiden Altersgruppen war nicht statistisch signifikant ($p=0,20$, Exakter Test nach Fisher).

Postoperativ war die Nachweisquote in der Gruppe der unter 68-jährigen Patienten auf 54,5 % gestiegen, es konnten in 6 der 11 zentralvenösen Proben Tumorzellen nachgewiesen werden. Der Mittelwert der Crossing Points beträgt 36,5 Zyklen mit einem Minimum von 34 und einem Maximum von 37 Zyklen. In der Gruppe der älteren Patienten konnte postoperativ ebenfalls in 7 von 11 Proben der Disseminierungsnachweis erbracht werden, somit waren wie in der präoperativen Analyse 63,6 % der Proben MAGE-A-positiv und somit nicht signifikant häufiger als bei jungen Patienten ($p=1,0$, Exakter Test nach Fisher).

Von den 19 durchgeführten Peritoneallavagen entfielen 10 auf die Gruppe der jüngeren, die restlichen 9 auf die Gruppe der älteren Patienten. Während lediglich in einer der 10 Spülungen (10,0 %) der unter 68-jährigen disseminierte Tumorzellen vorhanden waren, konnte bei 4 der 9 mindestens 68-jährigen Patienten ein entsprechender positiver Nachweis durchgeführt werden, was einem Anteil von 44,4 % entspricht. Der sichtbare Umschlagpunkt der positiven Probe aus der jüngeren Patientenhälfte lag bei 22 Umläufen, während die Polymerasekettenreaktionen bei den älteren Patienten nach 36 bzw. 37 Zyklen (Durchschnitt 36,7 Zyklen) als MAGE-A-positiv erkennbar waren. Es bestand keine statistische Korrelation der Nachweisrate in der Peritoneallavage mit dem Patientenalter ($p=0,14$, Exakter Test nach Fisher).

3.2.8 Abhängigkeit der Disseminierung vom Geschlecht

Insgesamt untersuchten wir 13 männliche und 9 weibliche Patienten. Präoperativ konnte bei 5 der 13 Männern (38,5 %) nach einheitlich 37 Amplifikationszyklen eine Disseminierung aufgezeigt werden. Aus der Gruppe der Frauen lieferten 5 von 9 Proben den Nachweis MAGE-A-positiver Zellen (55,6 %). Die sichtbaren Umschlagpunkte dieser Proben befanden sich in einem Intervall zwischen 33 und 37 Zyklen,

Ergebnisse

im Mittel bei 35,8 Umläufen. Der Unterschied in der präoperativen Nachweisrate zwischen Männern und Frauen war nicht signifikant ($p=0,67$, Exakter Test nach Fisher).

Die Analyse der postoperativen Blutproben erbrachte bei beiden Geschlechtern eine Steigerung der Nachweisquote disseminierter Tumorzellen. 53,8 %, also 7 von 13 der postoperativ entnommenen Proben von männlichen Patienten, waren in der RT-PCR positiv. Nach durchschnittlich 36,6 Umläufen, zwischen 35 und 37 Zyklen, war jeweils der Umschlagpunkt der Probe auszumachen. Von den 9 Frauen waren bei 66,7 % Tumorzellen nachweisbar (6 von 9 Proben). Der Unterschied in der postoperativen Nachweisrate in Abhängigkeit vom Geschlecht war nicht signifikant ($p=0,67$, Exakter Test nach Fisher).

Abschließend konnten wir von 12 der 13 Frauen und von 7 der 9 Männern intraoperativ eine Peritoneallavage gewinnen. 4 der 12 Männer wiesen in dieser Spüllösung MAGE-A-positive Zellen auf (33,3 %). Die Crossing Points lagen bei 36 bzw. 37 Zyklen, im Mittel bei 36,8 Zyklen. Bei lediglich einer der 7 Frauen (14,3 %) war eine Disseminierung nach 22 RT-PCR-Zyklen nachweisbar. Auch dieser Unterschied in der Nachweisrate MAGE-A-positiver Zellen zwischen Männern und Frauen war nicht statistisch signifikant ($p= 0,60$, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 2 zeigt noch einmal zusammenfassend die Häufigkeiten disseminierter Tumorzellen in zentralvenösem Blut und Peritoneallavage in Abhängigkeit der beschriebenen Parameter.

Ergebnisse

Tabelle 2	VOLLBLUT			PERITONEALLAVAGE	
Variable	Patienten- anzahl	MAGE-A (+) Prä-OP	MAGE-A (+) Post-OP	Patienten- anzahl	MAGE-A (+) Peritoneallavage
Total	22	10 (45,5 %)	13 (59,1 %)	19	5 (26,3 %)
Tumorausdehnung					
pT1-pT2	9	5 (55,6 %)	5 (55,6 %)	7	2 (28,6 %)
pT3-pT4	13	5 (38,5 %)	8 (61,5 %)	12	3 (25,0 %)
<i>p</i> -Wert*		<i>0,67</i>	<i>1,0</i>		<i>1,0</i>
Lymphknoten- beteiligung					
pN0	13	6 (46,2 %)	10 (76,9 %)	11	2 (18,2 %)
pN1-pN2	9	4 (44,4 %)	3 (33,3 %)	8	3 (37,5 %)
<i>p</i> -Wert*		<i>1,0</i>	<i>0,08</i>		<i>0,60</i>
Metastasen					
M0	16	7 (43,8 %)	10 (62,5 %)	13	2 (15,4 %)
M1	6	3 (50,0 %)	3 (50,0 %)	6	3 (50,0 %)
<i>p</i> -Wert*		<i>1,0</i>	<i>0,66</i>		<i>0,26</i>
Grading					
G1-G2	11	5 (45,5 %)	8 (72,7 %)	8	2 (25,0 %)
G3	11	5 (45,5 %)	5 (45,5 %)	11	3 (27,3 %)
<i>p</i> -Wert*		<i>1,0</i>	<i>0,39</i>		<i>1,0</i>
Tumortyp					
Kolorektal	14	7 (50,0 %)	10 (71,4 %)	11	2 (18,2 %)
Magen	7	3 (42,9 %)	3 (42,9 %)	7	3 (42,9 %)
Ösophagus	1	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1	0 (0,0 %)
<i>p</i> -Wert**		<i>0,61</i>	<i>0,21</i>		<i>0,42</i>
Alter					
<68 Jahre	11	3 (27,3 %)	6 (54,5 %)	10	1 (10,0 %)
≥68 Jahre	11	7 (63,6 %)	7 (63,6 %)	9	4 (44,4 %)
<i>p</i> -Wert*		<i>0,20</i>	<i>1,0</i>		<i>0,14</i>
Geschlecht					
männlich	13	5 (38,5 %)	7 (53,8 %)	12	4 (33,3 %)
weiblich	9	5 (55,6 %)	6 (66,7 %)	7	1 (14,3 %)
<i>p</i> -Wert*		<i>0,67</i>	<i>0,67</i>		<i>0,60</i>

* Exakter Test nach Fisher (2-seitig)

** Chi-Quadrat-Test nach Pearson

Ergebnisse

3.2.9 Abhängigkeit der Disseminierung vom Zeitpunkt der Entnahme der zentralvenösen Vollblutproben (präoperativ / postoperativ)

Insgesamt konnten wir geeignete zentralvenöse prä- und postoperative Blutprobenpaare von 22 Patienten gewinnen. Präoperativ konnten in zehn der 22 Proben disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden, was einem Prozentsatz von 45,5 % entspricht. In den postoperativ entnommenen Proben hingegen ergaben 13 der 22 Analysen ein MAGE-A-positives Ergebnis, was einem Anteil von 59,1 %. Der häufigere postoperative Nachweis von disseminierten Tumorzellen wies jedoch keine statistische Signifikanz auf ($p=0,27$, t-Test für gepaarte Stichproben; siehe Tabelle 3).

Wir führten daraufhin erneut eine Aufgliederung des Patientenkollektivs nach Ausdehnung des Primärtumors, Lymphknotenbeteiligung, Bestehen von Fernmetastasen, Differenzierungsgrad, Tumortyp, Alter und Geschlecht der Patienten durch und verglichen die Häufigkeit des Nachweises einer Disseminierung vor und nach erfolgter Resektion des Primärtumors.

Hierbei fiel auf, dass bei Patienten ohne bisher nachgewiesene Lymphknotenbeteiligung (Stadium pN0) im Anschluss an die Operation signifikant häufiger disseminierte Tumorzellen in der zentralvenösen Vollblutprobe nachweisbar waren als präoperativ ($p=0,04$, t-Test für gepaarte Stichproben).

Weiterhin war zu beobachten, dass ebenfalls bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorausdehnung (pT3 bzw. pT4), gut bis mäßig differenziertem Primärtumor (G1 bzw. G2) oder kolorektalem Karzinom postoperativ ebenfalls häufiger disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden konnten als präoperativ (p -Wert jeweils $0,08$, t-Test für gepaarte Stichproben).

In den übrigen Untergruppen konnte kein signifikant häufigerer Disseminierungsnachweis vor oder nach der Operation erbracht werden. Die detaillierten Ergebnisse sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Ergebnisse

Tabelle 3	VOLLBLUT			
Variable	Patienten- anzahl	MAGE-A (+) Prä-OP	MAGE-A (+) Post-OP	<i>p</i> -Wert (t-Test für gepaarte Stichproben)
Total	22	10 (45,5 %)	13 (59,1 %)	<i>0,27</i>
Tumorausdehnung				
pT1-pT2	9	5 (55,6 %)	5 (55,6 %)	<i>1,0</i>
pT3-pT4	13	5 (38,5 %)	8 (61,5 %)	<i>0,08</i>
Lymphknoten- beteiligung				
pN0	13	6 (46,2 %)	10 (76,9 %)	<i>0,04</i>
pN1-pN2	9	4 (44,4 %)	3 (33,3 %)	<i>0,59</i>
Metastasen				
M0	16	7 (43,8 %)	10 (62,5 %)	<i>0,19</i>
M1	6	3 (50,0 %)	3 (50,0 %)	<i>1,0</i>
Grading				
G1-G2	11	5 (45,5 %)	8 (72,7 %)	<i>0,08</i>
G3	11	5 (45,5 %)	5 (45,5 %)	<i>1,0</i>
Tumortyp				
Kolorektal	14	7 (50,0 %)	10 (71,4 %)	<i>0,08</i>
Magen	7	3 (42,9 %)	3 (42,9 %)	<i>1,0</i>
Ösophagus	1	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	-
Alter				
<68 Jahre	11	3 (27,3 %)	6 (54,5 %)	<i>0,19</i>
≥68 Jahre	11	7 (63,6 %)	7 (63,6 %)	<i>1,0</i>
Geschlecht				
männlich	13	5 (38,5 %)	7 (53,8 %)	<i>0,17</i>
weiblich	9	5 (55,6 %)	6 (66,7 %)	<i>0,68</i>

4. Diskussion

4.1 Methodendiskussion

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung und Anwendung einer neuen Methode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen. Neuartig ist die Anwendung eines quantitativen Verfahrens mit Schwellenwert. Zentraler Bestandteil dieser neu entwickelten Nachweismethode stellt das Design der verwendeten Primer dar. Viele bisherige Ansätze, die sich auf die Erkennung einzelner Vertreter der MAGE-A-Genfamilie beschränkten, waren durch das niedrige Expressionslevel der untersuchten Gene und die Heterogenität der Expressionsmuster in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Vorarbeiten haben allerdings gezeigt, dass die überwiegende Mehrheit der malignen Tumoren zumindest ein MAGE-Gen exprimiert. So berichten beispielsweise Hasegawa et al., dass 88% der untersuchten 80 kolorektalen Primärtumoren zumindest ein MAGE-Gen aufweisen, hingegen alle 80 Kontrollproben gesunden Gewebes MAGE-negativ blieben [19]. Aus diesem Grund verfolgten wir das Ziel, unsere Primer so zu gestalten, dass mehrere MAGE-A-Gene zusammen in einer Reaktion erkannt werden können. Hierbei konnten wir uns die Tatsache zu Nutze machen, dass die Vertreter der MAGE-A-Familie in hohem Maße (60-98%) in ihrer kodierenden Sequenz identisch sind; diese Übereinstimmung ist vorwiegend im letzten Exon lokalisiert [60]. Dadurch war es uns möglich, Primer zu verwenden, die gleichzeitig an die cDNA von MAGE-A1 bis MAGE-A6 binden konnten.

Diskussion

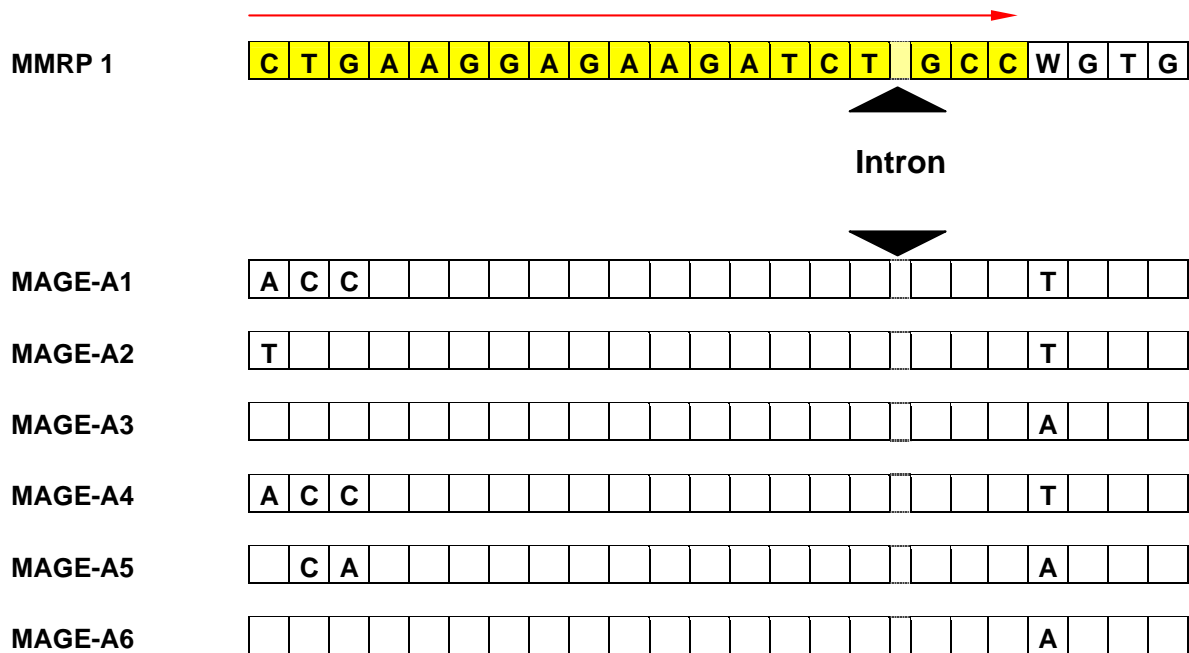


Abbildung 1: DNA-Homologie zwischen Primer und den unterschiedlichen MAGE-A-Genen (modifiziert nach [44])

- Leeres Feld repräsentiert Basen-Übereinstimmung zwischen Primer und MAGE-A-Gen
- „W“ bedeutet „A oder T“

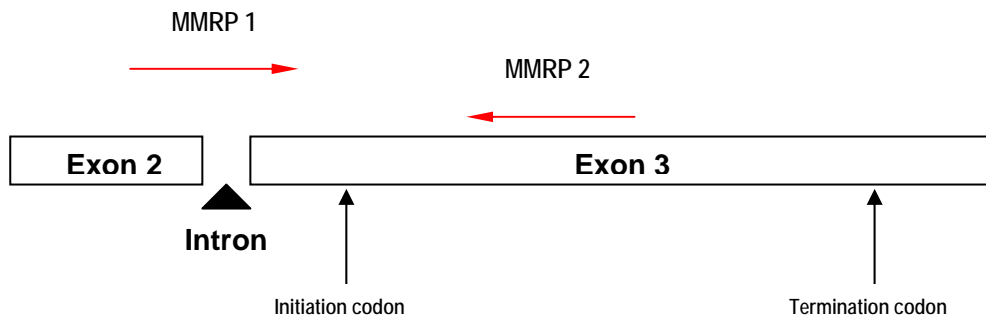


Abbildung 2: Bindungsstellen der MMRP am Beispiel des MAGE-3-Genes (nach [44])

Diese besondere Art von Primern wird als **Multiple MAGE subtypes Recognizing Primers**, kurz MMRP, bezeichnet. Durch das intronüberspannende Design war gleichzeitig sichergestellt, dass die Primerbindung nur an MAGE-kodierende Gensequenzen möglich war und keinerlei genomische DNA amplifiziert wurde; somit konnten falsch-positive Ergebnisse zuverlässig verhindert werden. Um Kontaminationen der Proben durch genomische DNA ausschließen zu können, wurden zusätzlich sogenannte „No-RT-Proben“ in die PCR eingesetzt, d.h. es wurde eine Probe mit einer äquivalenten

Diskussion

Menge Gesamt-RNA direkt in den LightCycler™ eingebracht, ohne vorher eine Reverse Transkription in cDNA durchzuführen. Da keine dieser No-RT-Proben ein positives Ergebnis hervorbrachte, war dadurch sichergestellt, dass jeder Nachweis von MAGE-A-Genen auch tatsächlich von disseminierten Tumorzellen ausgeht und nicht durch Amplifikation genomischer DNA bedingt ist. Diese Primer wurden bisher lediglich zur konventionellen RT-PCR verwendet [44]. Diese Arbeit berichtet erstmals ihre Verwendung in einer quantitativen RT-PCR. Mit diesem Verfahren kann ein Schwellenwert zur Unterscheidung von tumorspezifischen und unspezifischen Ergebnissen genutzt werden.

Als Probenmaterial haben wir in dieser Arbeit zentralvenös gewonnenes Vollblut verwendet. Hauptgrund für dieses Vorgehen bildete die Überlegung, einen möglichen Filtereffekt der Lunge ausschalten zu wollen. Zwar hat das Blut zum Abnahmezeitpunkt die Leber als Hauptmetastasierungs-ort bereits passiert, jedoch spielen im Rahmen des Metastasierungsprozesses gemäß der „Seed-and-Soil-Theorie“ [10] sowohl Eigenschaften der Tumorzelle selbst (= seed) als auch Einflussfaktoren in der jeweiligen Organumgebung (= soil) wie z.B. unterschiedliche Adhäsionsmoleküle eine kombinierte Rolle. Vor allem in letzterer Hinsicht wären durchaus Unterschiede zwischen Leber und Lunge denkbar. Um diese Frage jedoch hinreichend zu untersuchen, müsste gleichzeitig zentralvenöses und peripheres Blut entnommen und jeweils auf das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen untersucht werden. Da es sich in dieser Arbeit aber um eine andere Fragestellung handelte (ob mit der MAGE-PCR Tumorzellen nachgewiesen werden können und wie sie mit den klinischen Parametern korrelieren), wurde aus Gründen der Praktikabilität ausschließlich zentralvenöses Blut gewählt, da im Rahmen der Operation präoperativ bei allen Patienten ein zentraler Venenkatheter (ZVK) gelegt wird.

Weiterhin war es uns wichtig, eine Aufarbeitungsmethode zu verwenden, die ausschließlich das genetische Material *ganzer* Zellen berücksichtigt. Kufer et al. [29] beispielsweise entwickelten eine PCR, bei der auch die in den Proben vorhandene unspezifische, freie RNA erkannt wurde. Durch die dargestellte Aufarbeitung unserer Vollblutproben über Percoll und die daraus resultierende

Diskussion

Phasentrennung hingegen war gewährleistet, dass ausschließlich die mononukleäre Zellfraktion, die auch die disseminierten Tumorzellen enthält, zur RNA-Gewinnung herangezogen wurde und Kontaminationen durch unspezifische RNA-Bruchstücke dadurch vermieden werden konnten. Des Weiteren konnte während der anschließenden mikroskopischen Begutachtung der Zellen durch die Färbung mit Trypanblau auch gesichert werden, dass es sich um vitale Zellen handelt, deren RNA im Folgenden in die Analyse eingesetzt wird. Somit trägt auch dieser Aspekt der Aufarbeitungsmethode wesentlich dazu bei, falsch-positive Resultate zu verhindern.

Um die Sensitivität der Methode beurteilen zu können, haben wir uns entschlossen, Zellverdünnungsexperimente durchzuführen, bei denen Vollblutproben nachweislich gesunder Patienten unter mikroskopischer Kontrolle von Hand mit unterschiedlichen definierten Anzahlen an Zellen einer Kolonkarzinom-Zelllinie (HT 29) versetzt wurden. Auf diese Art und Weise war vor allen bei den Proben mit fünf bzw. zehn HT 29-Zellen sichergestellt, dass sich tatsächlich die gewünschte Zellzahl in der Probe befindet; eventuelle stochastische Abweichungen in beide Richtungen, wie sie zum Beispiel bei der Verwendung von Verdünnungsreihen und errechneten Zellkonzentrationen entstehen, konnten so zuverlässig ausgeschlossen werden. Diese Experimente brachten das Ergebnis, dass mit dem verwendeten Analyseverfahren das Vorhandensein von fünf einzelnen Tumorzellen in zehn Milliliter zentralvenösem Vollblut nachgewiesen werden kann. Umgerechnet entspricht dies einer Empfindlichkeit des Nachweises von einer malignen Zelle in 10^7 bis 10^8 mononukleären Zellen. Es zeigt sich also eine deutliche Überlegenheit im Vergleich zu bisher standardmäßig verwendeten Verfahren. Unter Anwendung immunzytochemischer Nachweismethoden liegt die Nachweisgrenze sowohl bei Pankreaskarzinomen [55] als auch bei Magenkarzinomen [51] in der Identifikation einer Tumorzelle unter maximal 10^6 nicht-neoplastischen Zellen. Somit ist die Sensitivität unserer Methode um den Faktor 100 höher. Bisherige PCR-basierte Nachweismethoden waren in der Lage, ca. 2 bis 5 maligne Zellen unter 10^7 mononukleären Zellen zu differenzieren [16]. Somit zeigt sich auch im Vergleich damit eine rund um den Faktor 10 höhere Sensitivität.

Diskussion

Um ebenfalls die notwendige Spezifität der Methode untersuchen zu können, haben wir uns dazu entschlossen, zentralvenöses Vollblut von Patienten ohne Tumorerkrankung als Negativkontrollen in die Analysen miteinzubeziehen. Insgesamt wurden 14 derartige Proben von uns untersucht, alle wurden auch korrekt als MAGE-negativ erkannt. Somit beträgt die Spezifität der Methode 100%. Viele bisherige Arbeiten (wie z.B. Weitz et al.) [58] verzichteten in ihrem Studiendesign entweder ganz auf Tests von Proben gesunder Patienten oder hatten häufig eine signifikante Zahl falsch positiver Proben zu beklagen. So erbrachten beispielweise in einer Kontrollgruppe von 45 Patienten 3 Proben einen falsch positiven Nachweis disseminierter Tumorzellen eines Pankreaskarzinoms [55].

Generell sollte idealerweise parallel zur Suche nach MAGE-positiven Zellen im Blut betroffener Patienten immer auch der jeweilige Primärtumor auf die vorhandene Expression von MAGE-Genen untersucht werden. Leider blieb uns diese Möglichkeit der direkten Untersuchung des Primärtumors verwehrt, da dieser in toto in Paraffin eingebettet wurde und die RNA-Ausbeute aus diesem Material zu gering für eine MAGE-A-RT-PCR ist. Auch eine eventuelle immunhistologische Untersuchung liefert aufgrund der geringen Expressionsrate der MAGE-Gene und möglicher Kreuzreaktionen der hierfür verwendeten Antikörper keine ausreichend zuverlässigen Ergebnisse [26]. Ebenfalls kann diskutiert werden, inwiefern überhaupt eine zwingende Übereinstimmung im Expressionsmuster der MAGE-Gene zwischen Zellen des Primärtumors und disseminierten Tumorzellen bestehen muss. Möglicherweise findet eine entsprechende Genexpression erst im Laufe des Metastasierungsprozesses statt, unter Umständen könnte die Expression von MAGE-Genen in Kombination mit anderen Faktoren Zellen überhaupt erst dazu befähigen, sich vom Primärtumor absiedeln zu können. Diese Zusammenhänge sind bis zum heutigen Tage noch nicht ausreichend untersucht und sollten Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

Diskussion

Das Hauptproblem vieler bisheriger Ansätze zum Nachweis disseminierter Tumorzellen stellte die mangelnde Spezifität der eingesetzten Marker dar. Durch die Hintergrundexpression der zum Nachweis eingesetzten Differenzierungsmarker oder Tumor-assoziierten Antigene wie zum Beispiel CK20 oder CEA in *nicht*-malignen Blutzellen war somit die Aussagekraft der so gewonnenen Ergebnisse oft stark limitiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Melanoma-Antigen Gene (MAGE) besitzen nun den großen Vorteil einer außerordentlich eingeschränkten Genexpression. So konnten sie bisher in einer großen Bandbreite maligner Tumoren nachgewiesen werden, darunter Karzinome des Magens [32], Ösophagus [24], Kolons und Rektums [35], nicht jedoch in gesunden, nicht-tumorösen, adulten Geweben mit Ausnahme von Keimzellen des Hodens, denen allerdings Major Histocompatibility Complex (MHC)-Moleküle fehlen und daher keine MAGE-A-Antigene präsentieren [12]. Aus diesem Grund können die hier verwendeten Zielstrukturen als tumorspezifisch bezeichnet werden.

Die MAGE-Gene kodieren für Proteine, deren physiologische Funktion bisher ungeklärt ist und die erstmals bei Malignen Melanomen beschrieben wurden. Sie werden von HLA Klasse I Molekülen präsentiert und von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt [29]. Unterteilt werden die Melanoma-Antigen Genes in vier Untergruppen: MAGE-A, -B, -C, und -D. Die MAGE-A-Genfamilie stellt eine Familie von mindestens zwölf eng verwandten Genen dar, die alle zusammen auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert sind (Region Xq28). Die überwiegende Mehrheit der bisher untersuchten Tumoren zeigten in erster Linie eine Expression von MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6 und auch -A12. [27, 12, 50]. Die von uns aufgrund dieser signifikanten Häufung ausgewählten Gene stellen somit hervorragend geeignete Zielstrukturen dar.

4.2 Diskussion der klinischen Daten

Disseminierte Tumorzellen konnten präoperativ bei 45,5 % (10 von 22), postoperativ bei 59,1 % (13 von 22) der untersuchten Patienten mit gastrointestinalen Tumoren nachgewiesen werden. Frühere Studien, die sich Nachweismarkern wie CK 20 oder CEA bedienten, zeigten häufig große Schwankungsbreiten

Diskussion

hinsichtlich der Erkennungsraten im Blut; größtenteils lagen sie zwischen 30 und 80 % [58, 34, 11, 8]. Somit befinden sich unsere gewonnenen Daten ungefähr in der Mitte dieses Intervalls. Allerdings mussten vorausgehende Studien über einen bis zu 20 %igen Anteil falsch-positiver Ergebnisse berichten, wo bei Patienten ohne Tumorerkrankung fälschlicherweise maligne Zellen im Blut erkannt worden waren [34]. In der Tatsache, dass alle gesunden Kontrollpatienten bei uns auch als solche identifiziert werden konnten, liegt wohl einer der größten Vorteile dieser neuen Analysemethode gegenüber früheren Ansätzen.

Des Weiteren zeigte sich in unseren Untersuchungen keinerlei Abhängigkeit des Nachweises disseminierter Tumorzellen von Tumorausdehnung, Lymphknotenbeteiligung, Fernmetastasen, Grading, Tumortyp, Alter oder Geschlecht des Patienten. Diese Erkenntnis deckt sich zum einen mit den Ergebnissen von Park et al. aus dem Jahr 2002, die aus einer Analyse von 38 Patienten mit kolorektalem Karzinom hervorgehen [45]. Zum anderen erscheint diese Feststellung auch durchaus plausibel, wenn man den Metastasierungsprozess etwas genauer betrachtet. So ist mittlerweile bekannt, dass die Disseminierung maligner Zellen bereits sehr früh im Verlauf einer Tumorerkrankung stattfindet. In der Regel ist davon auszugehen, dass zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits eine Aussaat von Zellen stattgefunden hat. Ein bestimmter Anteil dieser Tochterzellen kann anschließend in ein teilungsinaktives Stadium übertreten und so über Jahre im Körper überleben, ohne von in der Zwischenzeit eingeleiteten Chemotherapien angegriffen werden zu können, da diese nur sich aktiv teilende Zellen erreichen können [40]. Durch dieses auch als „tumour dormancy“ bezeichnetes Phänomen lassen sich häufig noch nach Jahren auftretende Spätmetastasen erklären, obwohl eine adäquate Resektion des Primärtumors stattgefunden hat [10].

Auffällig war allerdings weiterhin die höhere Nachweisrate der postoperativen im Vergleich zu den präoperativen Vollblutproben. Der Anstieg der MAGE-positiven Ergebnisse von 45,5 % präoperativ auf 59,1 % postoperativ war zwar insgesamt nicht statistisch signifikant ($p=0,27$; t-Test für gepaarte

Diskussion

Stichproben), dennoch konnte zumindest in der Untergruppe der Patienten ohne nachgewiesene Lymphknotenbeteiligung (pN0) postoperativ signifikant häufiger eine Disseminierung nachgewiesen werden als vor der Operation ($p=0,04$, t-Test für gepaarte Stichproben). Ebenfalls waren bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorausdehnung (pT3 bzw. pT4), gut bis mäßig differenziertem Primärtumor (G1 bzw. G2) oder kolorektalem Karzinom postoperativ häufiger disseminierte Tumorzellen nachgewiesen worden als präoperativ (jeweils $p=0,08$, t-Test für gepaarte Stichproben). Aufgrund der niedrigen zu Grunde liegenden Fallzahl sollten diese p -Werte der jeweiligen Subgruppenanalyse jedoch mit großer Vorsicht interpretiert werden. Sie werfen die Frage auf, ob durch entsprechende Manipulation am Primärtumor während der Operation die Aussaat von Tumorzellen und das eventuelle Auftreten von Spätmetastasen iatrogen begünstigt werden. Erstmals wurde ein solcher Einfluß in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts beschrieben. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde in der Folgezeit die „No Touch Isolation Technik“ in der kolorektalen Tumorchirurgie eingeführt. Diese Technik wurde bei der Resektion aller kolorektalen Karzinome der vorliegenden Studie verwendet, so dass hier die Operation nicht zu einer zusätzlichen Disseminierung führen konnte. Darüber hinaus ist es sehr unwahrscheinlich, dass in der pN0-Gruppe diese OP-Technik weniger als sonst beachtet wurde, jedenfalls fand sich in den OP-Protokollen hierfür kein Anhalt. Möglicherweise besitzen Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen ein höheres Potential zur Disseminierung. Wenn man das Patientenkollektiv nach dem Tumortyp stratifiziert, so fällt weiterhin auf, dass nur bei kolorektalen Karzinomen eine zusätzliche Disseminierung durch die Operation verursacht wurde, so dass sich auch hier die Frage stellt, ob kolorektale Karzinome ein höheres Disseminierungsrisiko besitzen als andere Tumortypen. Auch kann diskutiert werden, ob und wie die „No Touch Isolation Technik“ in derartigen Fällen noch weiter verfeinert werden sollte, falls dies operationstechnisch überhaupt möglich ist. Zur Untermauerung derartiger Hypothesen bedarf es jedoch einer weiteren Studie mit einer deutlich höheren Fallzahl. Hierfür wäre dann allerdings eine Punktion der Vena portae prä- und postoperativ erforderlich, was mit einem erhöhten Komplikationsrisiko einhergehen könnte. Daher müßte für eine derartige Studie eine entsprechende Patientenversicherung abgeschlossen werden und ein erneutes Ethikvotum eingeholt

Diskussion

werden. Aufgrund der relativ geringen Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Patienten lässt sich hier jedoch keine sichere Aussage treffen, welchen Stellenwert die Operation selbst auf die Disseminierung von malignen Zellen hat.

Weiterhin kann diskutiert werden, ob die postoperativ nachgewiesenen Tumorzellen nur ein passageres bzw. klinisch irrelevantes Phänomen darstellen. Derzeit gehen wir davon aus, dass einige Zeit nach Tumorresektion keine disseminierten Tumorzellen im Blut mehr vorhanden sind und ein unmittelbar postoperativer Nachweis ein vorübergehendes Phänomen ist. Daher wurde auf die Verlaufsuntersuchungen nach längerer Zeit (z.B. 7 Tage postoperativ) verzichtet. Zur klinischen Relevanz gibt es eine Arbeit bei Bronchialkarzinomen [59], die zeigte, dass hier der Nachweis disseminierter Zellen mittels CEA-RT-PCR in präoperativen Proben vor Tumorresektion einen prognostischen Einfluss hat und bei postoperativem Nachweis eine noch ungünstigere Prognose besteht.

Für weiterführende Forschungsarbeiten haben wir ein hochsensitives und –spezifisches Verfahren zum Nachweis disseminierter Tumorzellen etabliert, auf dessen Grundlage es in der Zukunft gelingen könnte, denjenigen Anteil an Patienten zu identifizieren, die an einer „Minimal Residual Disease“ leiden, um sie spezifischen adjuvanten Immuntherapiekonzepten mit MAGE als Zielstruktur zuzuführen und so das späte Auftreten von Metastasen zu verhindern. Anti-MAGE-Immuntherapien sind bisher bei Malignen Melanomen und auch im adjuvanten Setting bei Bronchialkarzinomen untersucht worden und zum Teil sehr erfolgreich [54]. In weiteren Studien sollte nun der Nutzen eines derartigen Therapieverfahrens auch für die Anwendung im Bereich der malignen gastrointestinalen Tumoren untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Ahuja N, Issa JP: Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol* 2000;15:835-842
- [2] Aubele,M.; Mattis,A.; Zitzelsberger,H.; Walch,A.; Kremer,M.; Hutzler,P.; Hofler,H.; Werner,M.: Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridisation. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1999;110:94-102
- [3] Bailar III JC, Gornik HL: Cancer undefeated. *N Engl J Med* 1997; 336:1569-1574
- [4] Behn M, Qun S, Pankow W, Havemann K, Schuermann M.: Frequent detection of ras and p53 mutations in brush cytology samples from lung cancer patients by a restriction fragment length polymorphism-based "enriched PCR" technique. *Clin Cancer Res.* 1998 Feb;4(2):361-71
- [5] Böckmann, B.; Grill, HJ; Giesing, M.: Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors. *Biomol Eng* 2001;17:3,95-111
- [6] Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, Hoon DS. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 1998 Aug;16(8):2632-40.
- [7] Braun S, Pantel K: Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 201-216
- [8] Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S.: Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 1999 Apr;79(11-12):1813-20.
- [9] Castells A, Boix L, Bessa X, Gargallo L, Pique JM.: Detection of colonic cells in peripheral blood of colorectal cancer patients by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Br J Cancer.* 1998 Nov;78(10):1368-72
- [10] Chambers AF, Groom AC, Mac Donald AC: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002 Aug;2(8):563-72
- [11] Chausovsky G, Luchansky M, Figer A, Shapira J, Gottfried M, Novis B, Bogelman G, Zemer R, Zimlichman S, Klein A.: Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach, and lung. *Cancer.* 1999 Dec 1;86(11):2398-405.
- [12] De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Basseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, et al.: Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics.* 1994;40(5):360-9.
- [13] Fidler IJ: The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.*2003Jun;3(6):453-8.
- [14] Fidler,IJ.: Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 1978;38:2651-2660.

Literaturverzeichnis

- [15] Fogh et al., in *Human Tumor Cells in Vitro* (ed. Fogh J.), Plenum Press, New York, 1975, pp. 115-159
- [16] Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M.: Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol.* 1994 Apr;12(4):725-9.
- [17] Gozzetti A, Le Beau MM: Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000;37:320-333.
- [18] Haga S, Watanabe O, Shimizu T, Imamura H, Iida T, Makita M, Kajiwara T.: The clinical value of tissue carcinoembryonic antigen in breast cancer. *Jpn J Surg.* 1991 May;21(3):278-83.
- [19] Hasegawa H, Mori M, Haraguchi M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T: Expression spectrum of melanoma antigen-encoding gene family members in colorectal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1998 Jun; 122(6):551-4.
- [20] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826.
- [21] Hermanek, P.: Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer Res* 1999;19:4A,2771-2774.
- [22] Hermanek, P.jr: What's new in TNM. *Pathol Res* 1994; 190:97
- [23] Hirsch, FR; Franklin, WA; Gazdar, AF; Bunn, PA: Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advantages in biology and radiology. *Clin Cancer Res* 2001;7:5-22.
- [24] Inoue H, Mori M, Li J, Mimori K, Honda M, Nakashima H, Mafune K, Tanaka Y, Akiyoshi T.: Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes. *Int J Cancer.* 1995 Nov 15;63(4):523-6.
- [25] Jonas S, Windeatt S, O-Boateng A, Fordy C, Allen-Mersh TG.: Identification of carcinoembryonic antigen-producing cells circulating in the blood of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Gut.* 1996 Nov;39(5):717-21.
- [26] Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, Spagnoli GC, Old LJ.: Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer.* 2000 Feb 15;85(4):460-5.
- [27] Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J.: Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *APMIS.* 1998 Jul;106(7):665-79.
- [28] Ko Y, Klinz M, Totzke G, Gouni-Berthold I, Sachinidis A, Vetter H.: Limitations of the reverse transcription-polymerase chain reaction method for the detection of carcino-embryonic antigen-positive tumor cells in peripheral blood. *Clin Cancer Res.* 1998 Sep;4(9):2141-6.

Literaturverzeichnis

- [29] Kufer P, Zippelius A, Lutterbuse R, Mecklenburg I, Enzmann T, Montag A, Weckermann D, Passlick B, Prang N, Reichardt P, Dugas M, Kollermann MW, Pantel K, Riethmüller G.: Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. *Cancer Res.* 2002 Jan 1;62(1):251-61.
- [30] Kuukasjarvi,T.; Karhu,R.; Tanner,M.; Kahkonen,M.; Schaffer,A.; Nupponen,N.; Pennanen,S.; Kallioniemi,A.; Kallioniemi,O.P.; Isola,J.: Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res.* 1997;57:1597-1604.
- [31] Lacroix, J., von Knebel Doeberitz, M.: Technical aspects of minimal residual disease detection in carcinoma patients. *Semin. Surg. Oncol.* 2001; 20:252-264.
- [32] Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T.:Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 1997 Sep-Oct;17(5A):3559-63.
- [33] Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S: Comparative Genomic Hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000;37:348-357.
- [34] Lukyanchuk VV, Friess H, Kleeff J, Osinsky SP, Ayuni E, Candinas D, Roggo A.: Detection of circulating tumor cells by cytokeratin 20 and prostate stem cell antigen RT-PCR in blood of patients with gastrointestinal cancers. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun;23(3B):2711-6.
- [35] Mori M, Inoue H, Mimori K, Shibuta K, Baba K, Nakashima H, Haraguchi M, Tsuji K, Ueo H, Barnard GF, Akiyoshi T.: Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. *Ann Surg.* 1996Aug;224(2):183-8.
- [36] Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akiyoshi T.: Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995 Aug 1;55(15):3417-20.
- [37] Nathan CA, Franklin S, Abreo FW, et al.: Analysis of surgical margins with the molecular marker EIF4E: a prognostic factor in patients with head and neck cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2909-2914.
- [38] O'Connell,P.; Pekkel,V.; Fuqua,S.; Osborne,C.K.; Allred,D.C.: Molecular genetic studies of early breast cancer evolution. *Breast Cancer Res.Treat.* 1994;32:5-12.
- [39] Offner,S.; Schmaus,W.; Witter,K.; Baretton,G.B.; Schlimok,G.; Passlick,B.; Riethmüller,G.; Pantel,K.: p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:6942-6946.
- [40] Pantel K, Müller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S.: Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Dec 15;9(17):6326-34.
- [41] Pantel, K.; Riethmüller, G.: Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1996; 213 (Pt 3): 1-18.

Literaturverzeichnis

- [42] Pantel K, von Knebel DM: Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol* 2000;12:95-101.
- [43] Pantel,K.; von Knebel Doeberitz M.; Izbicki,J.R.; Riethmuller,G.: Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Chirurg* 1997; 68:1241-1250.
- [44] Park JW, Kwon TK, Kim IH, Sohn SS, Kim YS, Kim CI, Bae OS, Lee KS, Lee KD, Lee CS, Chang HK, Choe BK, Ahn SY, Jeon CH.: A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. *J Immunol Methods*. 2002 Aug 1;266(1-2):79-86.
- [45] Park MS, Park JW, Jeon CH, Lee KD, Chang HK.: Expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE) by common primers for MAGE-A1 to -A6 in colorectal carcinomas among Koreans. *J Korean Med Sci*. 2002 Aug;17(4):497-501.
- [46] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:2,33-64.
- [47] Passlick B; Pantel K: Detection and relevance of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes. *Recent Results Cancer Res* 2000;157:29-37.
- [48] Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch*, 259. Auflage, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, S. 1529 und 1564.
- [49] Robinson, PJ: Imaging liver metastases: current limitations and further prospects. *Br J Radiol* 2000;73:234-241.
- [50] Rogner UC, Wilke K, Steck E, Korn B, Poustka A.: The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28. *Genomics*. 1995 Oct 10;29(3):725-31.
- [51] Seeliger H, Spatz H, Jauch KW. Minimal residual disease in gastric cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2003;162:79-87.
- [52] Somers VA, Pietersen AM, Theunissen PH, Thunnissen FB. Detection of K-ras point mutations in sputum from patients with adenocarcinoma of the lung by point-EXACCT. *J Clin Oncol*. 1998 Sep;16(9):3061-8.
- [53] van der Toorn PP, Veltman JA, Bot FJ, et al.: Mapping of resection margins of oral cancer for p53 overexpression and chromosome instability to detect (pre)malignant cells. *J Pathol* 2001;193: 66-72.
- [54] Vansteenkiste, J., Zielinski, M., Dahabre, J., Linder, A., Malinowski, W., Jassem, J., Lopez-Brea, M., Passlik, B., Lehmann, F., Brichard, V.: Multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled phase II study to assess the efficacy of recombinant MAGE-A3 vaccine as adjuvant therapy in stage IB/II MAGE-A3-positive, completely resected non-small cell lung cancer (NSCLC). *ASCO Meeting Abstracts* 2006; 24; no. 18 suppl: 7019
- [55] Vogel I, Kruger U, Marxsen J, Soeth E, Kalthoff H, Henne-Bruns D, Kremer B, Juhl H. Disseminated tumor cells in pancreatic cancer patients detected by immunocytology: a new prognostic factor. *Clin Cancer Res*. 1999 Mar;5(3):593-9.

Literaturverzeichnis

- [56] von Knebel Doeberitz, M.; Gebert, J.; Herfarth, Ch.: Effect of molecular diagnostic procedures on surgical therapy of malignant diseases. *Chirurg* 1996; 67:10, 967-979.
- [57] von Knebel Doeberitz M.; Lacroix,J.: Nucleic acid based techniques for the detection of rare cancer cells in clinical samples. *Cancer Metast Rev* 1999; 18: 43-64.
- [58] Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schroedel A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M.: Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin Cancer Res.* 1999 Jul;5(7):1830-6.
- [59] Yamashita, J., Matsuo, A., Kurusu, Y., Saishoj, T., Hayashi, N., Ogawa, M.: Preoperative evidence of circulating tumor cells by means of reverse transcriptase – polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA in an independent predictor of survival in non-small cell lung cancer: a prospective study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2002; 124; 2:299-305.
- [60] Zammatteo N, Lockman L, Brasseur F, De Plaen E, Lurquin C, Lobert PE, Hamels S, Boon T, Remacle J. : DNA microarray to monitor the expression of MAGE-A genes. *Clin Chem.* 2002 Jan;48(1):25-34.
- [61] Zhang,J.S.; Caplin,S.; Bosman,F.T.; Benhattar,J.: Genetic diversity at the p53 locus between primary human colorectal adenocarcinomas and their lymph-node metastases. *Int.J.Cancer* 1997; 70:674-678.

Danksagung

Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichsten Dank.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Klaus Hallfeldt, und dem Ärztlichen Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt der Universität München, Herrn Professor Dr. med. Wolf Mutschler, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit zur Promotion. Weiterhin möchte ich bei meinem Betreuer, Herrn Doktor Stefan Schmidbauer, für seine kontinuierliche Unterstützung des Projekts bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Doktor Wulf Sienel, ohne dessen uneingeschränkte Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sowohl während seiner Zeit in München als auch nach seinem Wechsel nach Freiburg war er zu jeder Zeit bei allen Problemen und Fragen ein kompetenter und geduldiger Ansprechpartner. Von ihm gingen in zahlreichen Gesprächen fundierte Empfehlungen, aber auch die nötige konstruktive Kritik und Motivation aus, die dieser Arbeit zu einem erfolgreichen Ende verholfen haben. Insbesondere konnte ich auch bei statistischen Fragestellungen auf seine Hilfe vertrauen.

Großen Dank schulde ich weiterhin meiner Labormitarbeiterin, Frau Andrea Kratschmar, mit der eine für beide Seiten wertvolle und effektive Zusammenarbeit im Verlauf der letzten Jahre möglich war. Weiterhin danke ich allen anderen Mitarbeitern des Chirurgischen Forschungslabors, speziell Herrn Peter Neth und Frau Claudia Huber, für die methodische Unterweisung und Unterstützung im Verlauf der durchgeführten Experimente. Nicht vergessen möchte ich ein Dankeswort an alle beteiligten Kollegen der Chirurgie und Anästhesie, ohne deren Kooperationsbereitschaft eine funktionierende Probengewinnung für diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Danksagung

Dieser Abschnitt meines Lebens wäre ohne die kontinuierliche Unterstützung meiner Eltern, Luise und Walter Nischwitz, nicht möglich gewesen. Sie haben mir während der gesamten Zeit den Rücken frei gehalten, damit ich mich voll und ganz auf die Aufgaben des Medizinstudiums und der Promotion konzentrieren konnte.

Nur schwer in Worte zu fassen ist mein Dank an meine Freundin Sandra Lutz, die mich seit vielen Jahren, aber insbesondere auch während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

Erklärung

gemäß § 2 Abs. 2 bis 4 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 01. Juni 1983 in der Fassung der siebten Änderungssatzung vom 01. Juni 2005

Hiermit erkläre ich, diese Dissertation selbständig angefertigt zu haben, mich außer der angegebenen Hilfsmittel keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen zu haben.

Bisher habe ich an keiner anderen Doktorprüfung teilgenommen.

Die hier vorgelegte Dissertation wurde nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

München, den 4. Februar 2007

Matthias Nischwitz

Lebenslauf

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Matthias NISCHWITZ
Anschrift	Greiselstrasse 37 86399 Bobingen
Geburtsdatum / -ort	21. August 1977 in Bobingen
Familienstand	ledig
Konfession	römisch-katholisch

SCHULBILDUNG

1984 – 1988	Grundschule Bobingen
1988 – 1995	Gymnasium bei St. Anna Augsburg
1995 – 1997	Peutinger-Gymnasium Augsburg
	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife mit der Note 1,1

WEHRDIENST

1997 – 1998	Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Luftwaffe in Roth und Penzing
-------------	---

STUDIUM

Ab September 1998	Studium der Humanmedizin an der LMU München
März 2001	Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung mit der Note 2,0
April 2002	Bestehen des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0
März 2004	Bestehen des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung mit der Note 1,66
April 2005	Bestehen des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0 Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: 1,83

Lebenslauf

MEDIZINISCHE TÄTIGKEIT

Juli / Oktober 1998	Pflegepraktikum an der Klinik für Viszeralchirurgie und Plastische Chirurgie des Zentralklinikums Augsburg
August 2001	Famulatur in der Praxis Dr. Maximilian Herz, Facharzt für Allgemeinmedizin, Augsburg
Juli / August 2002	Famulatur in der Chirurgischen Klinik – Innenstadt der LMU München
März 2003	Famulatur in der Klinik für Anästhesie und Chirurgische Intensivmedizin des Kaiser-Franz-Josef-Spitals in Wien, Österreich
August 2003	Famulatur in der Praxis Dr. Maximilian Herz, Facharzt für Allgemeinmedizin, Augsburg
April bis Juni 2004	Praktisches Jahr im Fachbereich Chirurgie (Teil 1) am Princess Alexandra Hospital der University of Queensland in Brisbane, Australien
Juni bis August 2004	Praktisches Jahr im Fachbereich Chirurgie (Teil 2) am Singapore General Hospital der National University of Singapore, Singapur
August bis November 2004	Praktisches Jahr im Fachbereich Innere Medizin an der Medizinischen Klinik – Innenstadt der LMU München
Seit November 2004	Praktisches Jahr im Fachbereich Urologie am Klinikum Großhadern der LMU München
Seit 2004	Mitarbeit in der KVB Notfallpraxis am Vincentinum Augsburg zusammen mit Herrn Dr. med. Maximilian Herz
Seit Mai 2005	Tätigkeit als Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik-Innenstadt der Universität München

PROMOTIONSARBEIT

Seit April 2002	Experimentelle Doktorarbeit zu dem Thema: „Nachweis disseminierter Tumorzellen operabler gastrointestinaler Tumoren mittels quantitativer RT-PCR von Melanom Antigen (MAGE) - A - Transkripten Doktorvater: Prof. Dr. K. Hallfeldt
November 2002	H.J. Bretschneider Preis 2002 bei den 6. Chirurgischen Forschungstagen der Sektion Chirurgische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in Köln Publikation „Detection of tumor cells in blood basing on MAGE-A-expression profiling of operable non-small cell lung cancer“ in Langenbeck´s Archives of Surgery (2002) 387; 256
Bobingen, den 4. Februar 2007	