
Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt
Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. W. Mutschler

**NACHWEIS DISSEMINIERTER TUMORZELLEN
IN ZENTRAL-VENÖSEM BLUT BEI PATIENTEN
MIT OPERABLEN GASTRO-INTESTINALEN KARZINOMEN
MITTELS ECHTZEIT POLYMERASE-KETTENREAKTION VON
CYTOKERATIN 20 TRANSKRIPTEN**

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

vorgelegt von
Andrea Kratschmar

aus München
2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hallfeldt

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. B. Mayer
Priv. Doz. Dr. F. Kolligs

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. S. Schmidbauer

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2007

Inhalt

Inhalt	4
1. Einleitung	6
1.1. Epidemiologie gastro-intestinaler Karzinome	6
1.2. Prognosefaktoren bei gastro-intestinalen Karzinomen	7
1.3. Überblick zur Tumorentstehung und Metastasierung	8
1.4. Definition: Disseminierte Tumorzellen und Mikrometastasen	9
1.5. Nachweis disseminierter Tumorzellen	9
1.5.1. Nachweis mittels Immunhistochemie	10
1.5.2. Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	11
1.6. Ziele dieser Arbeit	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Herstellen von Positivkontrollen	15
2.1.1. Kultivierung von HT29-Karzinomzellen in der Zellkultur	15
2.1.2. Mischung von Blutproben von Probanden ohne Malignom mit HT29-Karzinomzellen	16
2.2. Herstellen der Negativkontrollen	17
2.3. Patientencharakteristika	17
2.4. Isolierung der mononukleären Zellfraktion	17
2.5. Zellyse und Kryokonservierung	20
2.6. RNA-Isolierung	21
2.6.1. RNA-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Methode	21
2.6.2. RNA-Isolierung über Silikat-Säulen	22
2.7. cDNA-Synthese	23
2.8. Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	25

Inhalt

3. Ergebnisse	29
3.1. Phenol-Chloroform-Proben	29
3.2. Negativkontrollen	30
3.3. Positivkontrollen	32
3.4. Patientenproben	33
4. Diskussion	40
4.1. Bewertung der Methode	40
4.1.1. Bewertung der Phenol-Chloroform-Extraktion	40
4.1.2. Nachweisgrenze und Spezifität im Vergleich mit anderen Arbeiten	41
4.2. Bewertung der Ergebnisse der Patientenproben im Kontext zur aktuellen Literatur	43
4.3. Zukunftsperspektiven	48
5. Zusammenfassung	50
6. Literaturverzeichnis	52
7. Danksagung	59
8. Lebenslauf	60

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie gastro-intestinaler Karzinome

Nach wie vor bilden Malignome insgesamt eine der häufigsten Todesursachen weltweit (48). Die Mehrzahl aller Malignome sind epithelialen Ursprungs. Besonders häufig sind die Karzinome des Gastro-Intestinaltrakts. Auf sie entfallen etwa ein Drittel aller Krebstodesfälle bei Männern, bei Frauen stehen die gastro-intestinalen Karzinome als Krebstodesursache zusammengenommen sogar noch vor dem Mamma-Karzinom (15).

Mortalität pro 100.000 Männer	Mortalität pro 100.000 Frauen	Krebslokalisation
77	45	gastro-intestinale Karzinome
62	16	Bronchialkarzinome
-	28	Mammakarzinome
25	-	Prostatakarzinome

Tabelle 1:
Tumorbedingte Sterbefälle nach Tumorlokalisation, Deutschland 2003 (51)

Bei den Karzinomen des Gastro-Intestinaltrakts ist nach wie vor die Operation mit einer konsequenten Entfernung des Primärtumors der Hauptansatzpunkt der Therapie. Jedoch kommt es selbst bei komplett (R_0) resezierten Tumoren in einem bestimmten Prozentsatz, oft auch erst nach einigen Jahren, zu systemischen Metastasen, welche dann zu einem ungünstigen weiteren Krankheitsverlauf führen. So werden etwa selbst in den Tumorstadien I und II nach UICC etwa 30-40% der Patienten mit kolorektalen Karzinomen letztendlich ein Rezidiv entwickeln (13).

Trotz breiter Forschung und vielversprechenden neuen Ansätzen in den letzten Jahren, sei es in der Chirurgie durch aufwendigere und radikalere Operationen oder in der Chemo- und Strahlentherapie mit neuen Medikamenten, ist die Mortalität bei gastro-intestinalen Karzinomen immer noch hoch (siehe Tabelle 2).

Einleitung

Lokalisation	relative 5-Jahres- Überlebensraten in %	relative 10-Jahres- Überlebensraten in %
Magen	~30	~30
Pankreas	<5	~3
Kolon	~60	~50
Rektum	~60	~50

Tabelle 2:
Relative Überlebensraten gastro-intestinaler Karzinome (51)

1.2. Prognosefaktoren bei gastro-intestinalen Karzinomen

Die Prognose von gastro-intestinalen Karzinomen hängt von mehreren Parametern ab: Der wichtigste Punkt ist der Erfolg der chirurgischen Therapie, d. h. eine möglichst radikale und komplette Entfernung des Tumors. Chirurgisch entspricht das einer R_0 – Situation. Die weitere Behandlung der Patienten wird dann von den Staging-Untersuchungen bestimmt (Tumorgröße, Befall der Lymphknoten, Fernmetastasen), d. h. von dem jeweiligen TNM-Stadium. In den letzten Jahren sind neben diesen herkömmlichen Parametern aus der TNM-Klassifikation auch andere Parameter auf zellbiologischer Ebene gefunden worden, welche Rückschlüsse auf die Aggressivität der einzelnen Tumoren zulassen. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass vor allem eine Aussage darüber getroffen werden muss, ob die Erkrankung schon generalisiert ist oder sich noch in einem lokalisierten Stadium befindet. Danach richtet sich auch die Therapieentscheidung entweder für oder gegen eine systemische Therapie.

Dieses Vorgehen kann jedoch nur ein bestimmtes statistisches Risiko für ein Rezidiv für jeden Patienten ergeben, eine individuelle Prognoseeinschätzung und die Identifizierung von einzelnen Patienten mit einem hohen Risiko für ein zukünftiges Rezidiv der Erkrankung und einer damit erforderlichen aggressiveren Therapie kann damit nicht erreicht werden. Dieses Problem hängt maßgeblich damit zusammen, dass die Aussagekraft der konventionellen bildgebenden Methoden eingeschränkt ist und frühe Stadien einer Tumorzell dissemination nicht erkannt werden können.

Selbst durch hochauflösende Verfahren mit MRT oder Spiral-CT können erst Zellverbände ab einer Größe von 3-5mm, was einer Zellanzahl von ca. 10^8 entspricht, dargestellt werden (25,52). Da leider bei einigen Patienten auch bei R₀-Situation, präoperativ kleinem Primärtumor sowie fehlenden Metastasen nach einiger Zeit dennoch eine Metastasierung vorhanden ist, muss von einer möglichen Frühmetastasierung ausgegangen werden, welche von den konventionellen Stagingmethoden aber nicht erkannt wird. In einigen Studien wurde dementsprechend gezeigt, dass der postoperative Nachweis von einzelnen disseminierten Tumorzellen in lokalen Lymphknoten, Blut oder Knochenmark ein signifikant erhöhtes Risiko für den Patienten darstellt, Fernmetastasen zu entwickeln (43,46,62).

1.3. Überblick zur Tumorentstehung und Metastasierung

Die Biologie der Entstehung von malignen Zellklonen ist nach wie vor nicht in allen Einzelheiten verstanden, es ist jedoch bekannt, dass dies ein in mehreren Schritten ablaufender Vorgang ist. Zuerst entstehen multiple genomische Veränderungen in einzelnen Zellen. Durch klonale Selektion entwickeln sich einzelne Zellklone mit unterschiedlichen Eigenschaften (35). Durch ihren Selektionsvorteil vermehren sich vor allem Zellen mit aggressivem Wachstumsverhalten und der Fähigkeit, sich den körpereigenen Immunzellen zu entziehen, besonders schnell. Durch weitere DNA-Alternationen bildet sich schließlich die Fähigkeit zur Invasion der extrazellulären Matrix, Invasion von Blutgefäßen und Angiogenese. Eine Metastasierung findet durch besonders aggressive Subgruppen von Zellen statt. Dies ist ein aktiver Prozess, welcher in mehreren Schritten abläuft einschließlich einer lokalen Invasion von extrazellulärer Matrix, Invasion in Blut- und Lymphgefäße, Überleben der Zellen in der Zirkulation und Extravasation im Gewebe von anderen Organen (1). Trotzdem ist die Bildung von Metastasen ein sehr komplexer Prozeß und nur eine minimale Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen (etwa 0,05%) überlebt und führt später zu klinisch manifesten Metastasen (10,63).

1.4. Definition: Disseminierte Tumorzellen und Mikrometastasen

Es muss zunächst eindeutig unterschieden werden, was unter einer Mikrometastase und disseminierten Tumorzellen verstanden wird, da diese Begriffe in der Literatur häufig synonym verwendet werden. Hermanek et al. grenzt diese Begriffe in einer seiner Arbeiten (24) deutlich voneinander ab:

Unter „isolierten“ oder „disseminierten Tumorzellen“ versteht man einzelne Zellen (oder höchstens minimale Zellcluster), bei denen keine Extravasation oder extravaskuläre Proliferation nachweisbar ist. Gebräuchlich ist ebenfalls der Begriff der „zirkulierenden Tumorzellen“ , ebenso wie „minimal residual disease“ (MRD: dieser Begriff wird vor allem bei Nachweis von Tumorzellen nach erfolgter primärer Therapie verwendet) oder „minimal residual cancer cells“ (MRCC) .

Davon abzugrenzen ist der Begriff der „Mikrometastase“: Darunter versteht man ein Zellaggregat von höchstens 0,2cm Durchmesser. Diese kann nur histologisch nachgewiesen werden und muss definitionsgemäß ein extravaskuläres Wachstum nach Durchtritt durch das Gefäß (oder Lymphsinus) mit meistens begleitender Stromareaktion aufweisen. Da diese Mikrometastasen bildgebend nicht darzustellen sind, wird auch der Begriff „okkulte Metastasen“ verwendet.

1.5. Nachweis disseminierter Tumorzellen

Die disseminierten Tumorzellen werden über das Blut verteilt, sie verstreuen sich entweder sofort in die Organe, beginnen sich zu teilen und bilden Metastasen, oder werden im Knochenmark – durch seine Filterfunktion - abgefangen und können dort dann teilweise jahrelang in einem inaktiven Stadium überdauern (24,40). Dieses spezielle Stadium wird auch als „tumor cell dormancy“ bezeichnet. Es wird davon ausgegangen, dass während dieses Stadiums die Tumorzellen nicht proliferativ sind, das heißt, sie befinden sich in einer Ruhephase (G_0 - Phase) und teilen sich nicht weiter (45). Das bedeutet aber auch gleichzeitig, dass sie einer Chemo- oder Strahlentherapie nicht zugänglich sind und ausserdem aufgrund ihrer Größe mit konventionellen bildgebenden Methoden nicht detektierbar sind.

Einleitung

Um zu verhindern, dass diese Tumorzellen später zu Metastasen werden, wäre demnach der erste Schritt, diese einzelnen Tumorzellen schon so früh wie möglich zu erkennen. Therapeutisch können diese einzelnen Zellen dann zum Beispiel ein Ziel einer Therapie mit spezifischen Antikörpern sein (49). Genau aus diesem Grund ist nun schon seit einiger Zeit versucht worden, diese Tumorzellen mit verschiedenen Methoden wie der Immunhistochemie oder der PCR nachzuweisen (28).

Solche Nachweise werden seit einiger Zeit bei anderen malignen Neoplasien wie zum Beispiel Mammakarzinomen schon vor der Therapie als prognostisches Kriterium oder nach verabreichter Primärtherapie verwendet und das Ergebnis mit in die weitere Therapieplanung einbezogen. Bei gastro-intestinalen Tumoren sind bis jetzt jedoch noch keine routinemäßigen Untersuchungen auf disseminierte Tumorzellen in den klinischen Alltag eingeführt worden.

Grundsätzlich kann ein solcher Nachweis aus verschiedenen Medien wie Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Urin, Stuhl oder Lavagen durchgeführt werden (42). Je nach Methodik ergeben sich sehr unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf Sensitivität und Spezifität: Da sich diese beiden Parameter leider meist gegenläufig verhalten, konnten in der Vergangenheit diesbezüglich oft nur unbefriedigende Ergebnisse erreicht werden.

1.5.1. Nachweis mittels Immunhistochemie

Für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen werden vor allem Proteine mit gewebsspezifischen Expressionsmustern wie Cytokeratine oder Membranantigene als Zielantigene verwendet. Die Sensitivität und Spezifität des Nachweises mittels immunhistochemischer Methoden variiert breit in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern wie dem Expressionsniveau des Zielantigens in Tumorzellen gegenüber normalen hämatopoetischen Stammzellen oder peripheren Blutzellen, der Affinität des primären Antikörpers und den verschiedenen Entwicklungstechniken zur Visualisierung bzw. quantitativen Auswertung der Antikörper.

Trotzdem konnten verschiedene Studien bei gastro-intestinalen Malignomen einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark und einem verkürzten krankheitsfreien Intervall (23,29) bzw. einer verkürzten

Überlebensrate (37) zeigen. Obwohl der prognostische Wert eines immunzytologischen Nachweises einer hämatogenen oder lymphogenen Tumorzell dissemination für mehrere Tumorarten gezeigt werden konnte, hat dieses Verfahren noch keinen Eingang in die klinische Routine des Stagings gefunden. Der größte Nachteil dieser Methode ist die unspezifische Anfärbung von Zellen nicht-epithelialer Herkunft, was eine vorsichtige und erfahrene zytologische Nachuntersuchung von positiven Zellen erfordert, um echte Tumorzellen zu identifizieren und falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Eine quantitative Auswertung von positiven Ergebnissen ist ausserdem schwer möglich.

Zudem kann die Expression von spezifischen Antigenen während der Dedifferenzierung der Karzinogenese bei undifferenzierten Karzinomen leicht verloren gehen (17).

1.5.2. Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In den letzten Jahren wurde deswegen immer mehr zu einem Nachweis der Tumorzellen mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) übergegangen. Die Methode beruht auf einem Nachweis von spezifischen mRNA-Molekülen, welche in den Tumorzellen, aber nicht in den sie umgebenden nicht-malignen Zellen vorhanden sind. Für den sensitiven Nachweis von Tumorzellen werden verschiedene mRNA Transkripte mit karzinom- oder gewebsspezifischen Expressionsmustern verwendet. Die Ergebnisse unterscheiden sich in Spezifität sowie Sensitivität je nach der Aktivität von RNasen in den Proben, verschiedenen Methoden der RNA-Isolierung, sowie Techniken zur Anreicherung von Tumorzellen in den Proben.

Trotzdem sind die verschiedenen Ansätze grundsätzlich sehr ähnlich: Isolierung der RNA aus der Probe, reverse Transkription der RNA in cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase, Amplifikation der spezifischen cDNA und Detektion des Amplifikationsproduktes durch verschiedene Verfahren, zum Beispiel durch eine nested-PCR und Nachweis im Agarose-Gel, durch einen PCR enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA) oder durch Fluoreszenzemission wie bei der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion.

Einleitung

Wichtig für diese Methode ist also die sorgfältige Auswahl der Ziel-mRNA. Die Zielmarker müssen mehrere Eigenschaften aufweisen, um in Frage zu kommen. Geeignet sind Ziel-mRNAs mit einer ruhenden Transkription in nicht-malignen Zellen, einem hohen Transkriptionslevel in Karzinomzellen und keine vorhandenen Pseudogene, die ebenfalls prozessiert werden, und zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Die gebräuchlichsten und am besten untersuchten Marker bei gastro-intestinalen Karzinomen sind die Cytokeratine (CK). Diese sind als Bausteine des Zellskeletts den Intermediärfilamenten zuzuordnen. Sie sind Bestandteil von epithelialen Zellen verschiedener Herkunft. Schon seit längerem werden zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen bei gastro-intestinalen Karzinomen verschiedene Cytokeratine verwendet, wie CK7, CK8, CK18, CK19 und CK20. Unter diesen Markern ist inzwischen CK20 der am weitesten verbreitete, da bisherige Studien eine hohe Hintergrundexpression für die anderen Marker im Knochenmark, Lymphknoten und Blut von gesunden Probanden zeigten (3,14,18), deren Ursache wahrscheinlich sowohl im Vorhandensein von Pseudogenen als auch in einer unspezifischen Expression etwa durch hämatopoetische Stammzellen liegt. Zudem wird CK20 in einem Großteil von kolorektalen Primärtumoren sowie ihren Metastasen exprimiert (68).

In bisherigen Studien wurde CK20 schon verwendet, um disseminierte Tumorzellen im peripheren Blut (55), Knochenmark (57), Peritoneallavage (20) oder in Lymphknoten (21,66) von Tumorpatienten nachzuweisen. CK20 wurde in Kontrolluntersuchungen dieser Gewebe von gesunden Probanden nicht nachgewiesen (5,21). Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien jedoch auch von falsch-positiven Befunden berichtet (7), was unter anderem durch eine Hintergrundexpression von CK20 durch Granulozyten des peripheren Blutes erklärt werden kann (31). Dieses Problem hätte aber durch eine Separation der mononukleären Zellfraktion durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten umgangen werden können. Nichtsdestotrotz ist natürlich besonders durch das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen die Methode immer wieder in Frage gestellt worden (7).

Einleitung

Prinzipiell gibt es verschiedene Anmerkungen zu diesen Arbeiten: In einigen Arbeiten wurde peripher-venöses Blut verwendet (68), welches schon in den Lungen gefiltert wurde und dadurch wahrscheinlich weniger Tumorzellen enthält. Andere Arbeiten verwendeten Knochenmark, welches eigentlich als Material für einen Nachweis von Tumorzellen gut geeignet ist, aber für spätere Verlaufsuntersuchungen aus Rücksicht auf die Patienten und die Invasivität der Prozedur ungünstig zu gewinnen ist.

Für die vorliegende Studie wurde daher zentral-venöses Blut untersucht, da die Patienten perioperativ ohnehin einen zentralen Venenkatheter hatten und somit keine weiteren Unannehmlichkeiten durch die Probengewinnung entstand. Ausserdem wurde von einer höheren Tumorzellanzahl im zentral-venösen Blut verglichen mit peripher-venösem Blut ausgegangen, da bei zentral-venösem Blut die Lungenpassage mit einer potentiellen Filtrierung noch nicht stattgefunden hat. Zum Zweiten wurden in den genannten Studien oft keine quantitativen PCRs verwendet. Durch eine quantitative Bestimmung von Marker-Transkripten können jedoch anhand eines Schwellenwertes unspezifische Hintergrundtranskripte unterschieden werden, wodurch falsch-positive Resultate nicht mehr auftreten sollten.

1.6. Ziele dieser Arbeit

Um eine quantitative CK20 RT-PCR an zentral-venösem Blut zu etablieren und zu evaluieren, welche die zuvor aufgeführten Kritikpunkte vermeidet, wurde eine prospektive Studie initiiert.

Das erste Ziel war die Etablierung einer Methode Schritt für Schritt von der Blutentnahme bis zur quantitativen RT-PCR. Als Probenmaterial wurde jeweils ein prä-operativ sowie ein post-operativ abgenommenes EDTA-Vollblutröhrchen mit 7,5ml Blut verwendet. Zur Gewinnung der Tumorzellen und gleichzeitiger Separierung anderer Blutbestandteile wurde die Methode der Zellfraktionierung durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten gewählt. Durch das Isolieren der mononukleären Zellen aus dem Vollblut wurde ausgeschlossen, dass später in der PCR freie RNA, die von zugrunde gegangenen Zellen des Primärtumors oder anderen nicht mehr intakten Tumorzellen stammt, nachgewiesen wird.

Einleitung

Für die weitere Probenaufarbeitung wurden zwei Verfahren zur RNA-Gewinnung evaluiert, wobei dann im weiteren Ablauf ein Verfahren weitergeführt wurde. Für die eigentliche Nachweisreaktion mittels quantitativer RT-PCR wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Light-Cycler-CK20 Quantification Kit, Roche, Cat. No. 3118835), verwendet. Dieses Verfahren wurde auch im Hinblick auf eine einfache spätere Verwendung im klinischen Alltag, welches CK20 quantitativ durch eine Real-Time-PCR im Light-Cycler mittels Fluoreszenz nachweisen kann, gewählt. Es wurde angenommen, hierdurch eine höhere Spezifität zu erreichen, da durch eine quantitative Analyse falsch-positive Ergebnisse vermieden werden können.

Das zweite Ziel war die Evaluation der Methode anhand von Sensitivität und Spezifität. Um die Nachweisgrenze der Methode zu untersuchen, d. h. wieviele Tumorzellen pro Milliliter Blut noch detektiert werden können, wurden eigene Probenreihen mit einer definierten Anzahl von Tumorzellen hergestellt und überprüft. Die Spezifität wurde anhand der Untersuchung von Negativkontrollen von gesunden Probanden getestet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, gesammelte Patientenproben mit der Methode zu untersuchen und eventuelle statistische Zusammenhänge der Ergebnisse mit klinisch-pathologischen Parametern (TNM-Stadium, Histologie, Alter, Geschlecht) aufzudecken. Durch die Probenentnahme zeitnah prä- und postoperativ, wurde auch ein Einfluss der Operation auf eine mögliche perioperativ erhöhte Tumorzellaussaat untersucht. Zur Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit wurden Daten von vergleichbaren Studien aus der Literatur verwendet und diskutiert.

2. Material und Methoden

2.1. Herstellen von Positivkontrollen

Zur Überprüfung der Sensitivität der Methode und zur Untersuchung der Nachweisgrenze stellten wir Positivkontrollen mit einer bekannten Anzahl an enthaltenen Tumorzellen her.

2.1.1. Kultivierung von HT29-Karzinomzellen in der Zellkultur

Wir verwendeten für die Positivkontrollen eine kommerziell erhältliche Zelllinie von humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen (HT29). Die kryokonservierten HT29-Zellen (ca. 1×10^7 Zellen/ml) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort in 50ml Kulturmedium RPMI 1640 (Gibco) überführt, um das Kryokonservierungsmedium, welches SDS enthält, zu verdünnen, und so eine zelltoxische Wirkung zu verhindern. Die Zellsuspension wurde bei 500 x g für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde nun mit 50ml PBS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Kulturmedium RPMI 1640 resuspendiert. Es wurden etwa 3×10^5 Zellen in eine 75ml Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank bei 37°C, in 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert.

Die Zellen wurden alle drei Tage passagiert: Dazu wurden die konfluent gewachsenen Zellen zuerst zweimal mit 10ml PBS-Puffer gewaschen und dann für ca. fünf Minuten mit 3ml 0,05% Trypsin + 0,53 mM EDTA inkubiert, um die Zellen vom Boden abzulösen. Die Trypsinlösung wurde abgesaugt und die Zellen durch leichtes Abklopfen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenglas abpipettiert und mit der doppelten Menge an frischem Medium versetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 500 x g für ca. 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen mit neuem Medium in eine neue Kulturflasche überführt, wobei der Verdünnungsfaktor 1:10 war. Nach einer Woche wurden die Zellen nach erneuter Trypsinierung, Pelletierung und Waschen

mit PBS geerntet und auf eine Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml mittels Verdünnung durch PBS-Puffer eingestellt.

2.1.2. Mischung von Blutproben von Probanden ohne Malignom mit HT29-Karzinomzellen

Die so gewonnene Zellsuspension wurde in eine durchsichtige Petrischale mit einem Durchmesser von 5cm überführt. Um eine Adhäsion der Zellen an der Petrischale zu vermeiden, wurde die Petrischale mit fetalem Kälberserum (FKS) ausgeschwenkt. 5ml PBS-Puffer wurden in die Petrischale gegeben und gleichmäßig verteilt. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde aufgetragen und auf dem Boden der Petrischale vorsichtig ausgestrichen, so dass am Ende einzelne Zellen identifizierbar waren.

Unter dem Phasenlichtmikroskop wurde vorsichtig mit einer sterilen Ein-Mikroliter-Pipette unter Sicht einzelne Zellen in die Pipettenspitze eingesaugt. Jeweils fünf und zehn Zellen wurden in die Pipette aufgenommen. Die Zellen wurden danach sofort in eine bereitgestellte 10ml Blutprobe von gesunden Spendern transferiert und sorgfältig mit dem Vollblut vermischt (s. Abb. 1). Die Probe mit 100 und 1000 Zellen wurde durch entsprechende Verdünnung mit PBS-Puffer hergestellt und ebenfalls sofort in Vollblut von gesunden Probanden überführt.

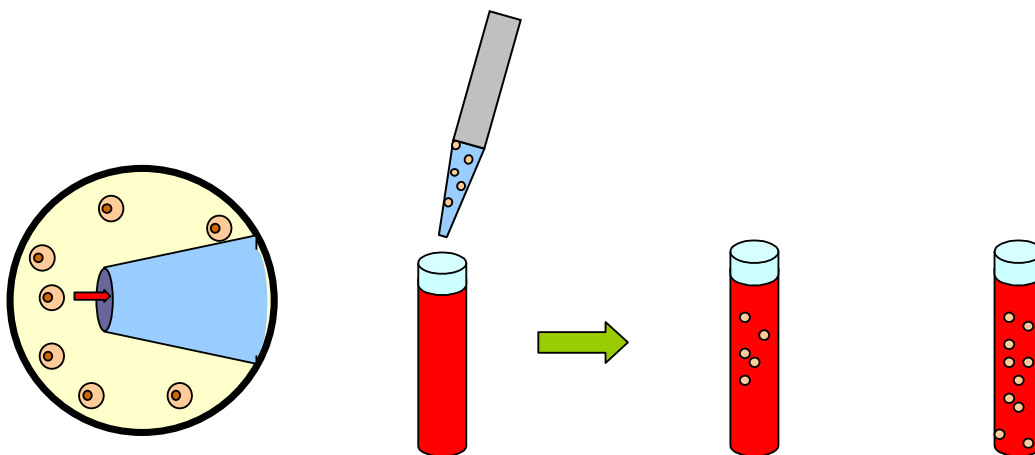


Abbildung 1:
Herstellen der Positivproben

*Aufnehmen einzelner HT29-Zellen unter Sicht unter dem Mikroskop mit einer 1- μ l-Pipette
Hinzufügen zu den bereitgestellten Blutproben und Vermischen durch Auf- und Abpipettieren*

Es wurde dadurch eine Reihe von Positivproben mit je 5, 10, 100 und 1000 Zellen in 10ml Vollblut hergestellt. Zur Kontrolle, ob unsere HT29-Zellreihe auch wirklich CK20 exprimiert, stellten wir auch eine reine HT29-Zellsuspension mit einer Million Zellen pro Milliliter her. Bei allen Positivproben wurde daraufhin die mononukleäre Zellfraktion isoliert, daraus die RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und im Light-Cycler Gerät analysiert.

2.2. Herstellung von Negativkontrollen

Da zur Überprüfung der Spezifität unserer Methode Negativkontrollen notwendig waren, wurde zentralvenöses Blut von Personen, die weder zu einem früheren Zeitpunkt noch bei Blutentnahme an einer Krebserkrankung litten, untersucht. Es wurde für diese Kontrollproben ebenfalls 7,5ml EDTA-Blut verwendet und auf die gleiche Weise wie o.e. weiterverarbeitet.

2.3. Patientencharakteristika

Das Studienprotokoll wurde vor Beginn der Arbeit von der Ethikkommission geprüft und positiv beschieden. Alle Patienten wurden vor Studienteilnahme über das gesamte Protokoll aufgeklärt und ihre Einwilligung schriftlich festgehalten. Eingeschlossen wurden insgesamt 22 Patienten mit einer histologisch gesicherten Diagnose eines gastro-intestinalen Malignoms. Patienten unter 18 Jahren wurden nicht in die Studie aufgenommen. Alle Patienten wurden einer kompletten Tumorresektion (R_0) unterzogen. Staging und Grading der Tumoren wurden nach der international gebräuchlichen TNM-Klassifikation der UICC (56) eingeteilt. Den Patienten wurde präoperativ, d.h. eine halbe Stunde vor Beginn der Operation sowie postoperativ, d.h. eine Stunde nach der Operation zentral-venöses Blut entnommen.

2.4. Isolierung der mononukleären Zellfraktion

Um sicherzugehen, dass wirklich nur ganze Zellen, die dann potentiell Metastasen bilden könnten, und keine freie zirkulierende RNA nachgewiesen wurden, war der erste Schritt der Probenaufbereitung die Isolierung der mononukleären Zellfraktion, in welcher sich auch die Tumorzellen befinden. Zudem kann hierdurch die Spezifität der

Material und Methoden

Methode erheblich gesteigert werden, da Granulozyten, die für falsch-positive Ergebnisse verantwortlich gemacht werden, entfernt werden. Die Proben wurden bis zu ihrer Aufarbeitung innerhalb der nächsten 24 Stunden bei 4°C gekühlt aufbewahrt. Im ersten Schritt wurden die Proben mit Hanks` Lösung (Hanks` Salt Solution (1x), Biochrom Ag, Berlin, Cat. No. 22045) gewaschen, indem die Proben in ein 15ml Röhrchen umgefüllt, mit Hanks` Lösung aufgefüllt und bei 170 x g zehn Minuten zentrifugiert wurden.

Die durch die Hanks`-Salzlösung ausgefällten Fette im Überstand wurden mit einer sterilen Pipette abgezogen. Die restliche Probe wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren nochmals vermischt. In ein neues 15ml Röhrchen wurden 6,5ml Percoll 50% vorgelegt. Percoll besteht ähnlich wie Ficoll aus kleinen Silica-Partikeln, die mit Polyvinylpyrrolidone beschichtet sind. Percoll ist nicht zelltoxisch und bei jedem pH-Wert und jeder Osmolalität verwendbar. Es zeigte sich außerdem in anderen Studien, in welchen verschiedene Percoll-Verdünnungen miteinander verglichen wurden, dass mit Percoll 50% die größte Zellausbeute erhalten wurde (Dissertation Dr. CA Klein, LMU München). Das Percoll 50% wurde folgendermaßen hergestellt: 100ml Percoll 100% (Percoll™, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala) wurden mit 9ml 10x Hanks`-Salzlösung (Hanks` Balanced Salts (10x), Gibco™ Invitrogen Corporation, UK, Cat. No. 14060-040) in einem sterilen Gefäß vermischt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 15%-iger HCl-Lösung vorsichtig auf 7,40 titriert. Die Lösung wurde dann durch einen Filter mit 0,2µm Poren (Sterifix® 0,2 µm, Luer Lock, Braun, Mat. No. 4099206) sterilfiltriert, um einem Wachstum von Bakterien oder Pilzen vorzubeugen. Danach wurde die Lösung mit einer sterilen 0,9%-igen NaCl-Lösung im Verhältnis 1:1 verdünnt und somit 50%-iges Percoll hergestellt.

Auf das vorgelegte Percoll wurde nun vorsichtig die Probe geschichtet, wobei eine Vermischung der beiden Phasen durch schräges Einlaufen über die Wand vermieden wurde.

Die Zentrifugation über den Dichtegradienten erfolgte bei 979 x g für 15 Minuten.

Nach der Zentrifugation stellten sich drei Phasen in den Probenröhrchen dar:

In der obersten Phase das Serum, dann die opaque Interphase mit den mononukleären Zellen und in der untersten Phase Percoll vermischt mit Erythrozyten und Zellfragmenten (s. Abb. 2).

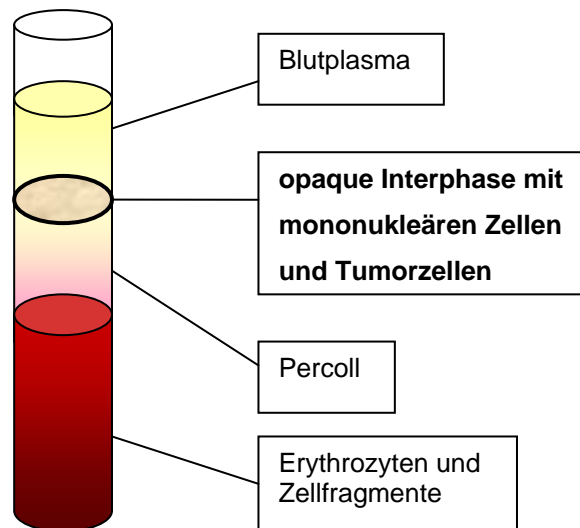


Abbildung 2:

Isolieren der mononukleären Zellfraktion

Nach der Zentrifugation über einen Dichtegradienten (Percoll 50%): Schichtung der einzelnen Phasen

Die oberste Phase wurde bis zwei Milliliter oberhalb der Interphase abgezogen und verworfen, die Interphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 50ml Röhrcchen überführt. Die restliche Probe mit den Erythrozyten und Zellfragmenten wurde verworfen. Das neue Röhrcchen mit den abpipettierten Zellen wurde mit PBS-Puffer (PBS-Dulbecco (1x), w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cat. No. L1825) auf 50ml aufgefüllt und bei 524 x g zehn Minuten lang zentrifugiert um damit alle Percollrückstände auszuwaschen. Die Zellen waren nach der Zentrifugation als weißes Zellpellet am Boden des Röhrcchens sichtbar. Der überschüssige PBS-Puffer wurde bis auf 1ml abpipettiert und die Zellen darin resuspendiert.

Um die Zellen zu zählen, wurden 10µl Zellsuspension entnommen und mit 10µl Trypanblau (Trypan Blue Solution 0,4%, Sigma Chemical Co., Lot. No. 60K 2414) vermischt. Die Zellen wurden damit angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei auch gleichzeitig beurteilt werden konnte, ob die Zellen noch vital waren (s.Abb. 3) .

Indem das Volumen der Zellsuspension durch Pipettieren ermittelt wurde, konnte dann die absolute Zahl der isolierten Zellen bestimmt werden.

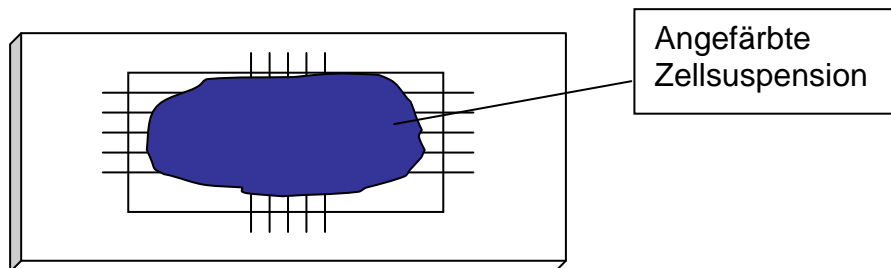


Abbildung 3:

Bestimmung der Zellzahl

Auszählen der Zellsuspension unter dem Mikroskop mittels einer Neubauer-Zählkammer

2.5. Zellyse und Kryokonservierung

Die restliche Zellsuspension wurde erneut zehn Minuten bei 524 x g zentrifugiert. Der komplette Überstand wurde verworfen, so dass nur noch das reine Zellpellet vorhanden war, in welchem sich zwischen 10^6 und 10^7 Zellen befanden. Zu den Zellen wurden 600µl einer Mischung aus RLT-Puffer (RLT Lysis Buffer, Mat. No. 1015750, Qiagen GmbH) und β -Mercaptoethanol (10µl β -Mercaptoethanol auf 1ml vorgefertigtem Puffer) gegeben und durch Auf-und Abpipettieren die Zellen damit lysiert. Das enthaltene β -Mercaptoethanol diente dabei der Stabilisierung der RNA. Die 600µl Zelllysate wurden auf eine Reinigungssäule (QIA Shredder™, Cat. No. 79654) pipettiert und für zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Durch die Zentrifugation durch diese Säulen wurden die Proben von störenden Zellfragmenten gereinigt. Die Proben wurden anschließend in einem 1,5ml Eppendorfgefäß bei -80°C bis zu ihrer weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.6. RNA-Isolierung

2.6.1. RNA-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Methode

Es wurde zunächst zur Isolierung der RNA aus der mononukleären Zellfraktion die Chomzcynsky-Methode (10) verwendet. Das Ausgangsmaterial waren hierbei 300µl Zellsuspension, die mit 900µl Trizol (TRIzol[®] Reagent, Cat. No. 15596-026, Gibco BRL) lysiert und bei -80°C eingefroren worden waren. Die Proben wurden für die Weiterverarbeitung ca. fünf Minuten bei 25°C im Wasserbad aufgetaut. Unter dem Abzug wurden dann jeweils 200µl Chloroform dazugegeben und etwa 15 Sekunden per Hand geschüttelt und vermischt. Die Proben wurden 3 Minuten inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 4°C mit 11.000 rpm zentrifugiert.

Als nächster Schritt wurde die obere wässrige Phase mit sterilen Spitzen in 1,5 ml Eppendorfgefäße unter dem Abzug abpipettiert, dabei musste darauf geachtet werden, dass auf keinen Fall etwas von dem Phenol mit abgezogen wird. Zum Fällern der RNA wurde zu jeder Probe 500µl eines Isopropanol-Na-Acetat-Glykogen-Gemisches gegeben. Dieses wurde aus 45ml Isopropanol (95%), 5ml Na-Acetat (3M, pH 5,2) und 40µl Glykogen (20 µg/µl) hergestellt. Die Probe wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert und erneut bei 11.000 rpm bei 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Es bildete sich ein gelatinöses Pellet am Boden der Tubes aus, welches die RNA enthielt. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet im Gefäß belassen und mit 1ml Ethanol (75%) ausgewaschen und erneut zehn Minuten wie zuvor zentrifugiert. Der Alkohol wurde nun abpipettiert und das Pellet bei Raumluft getrocknet. Zur Resuspension wurde am Schluss 60µl RNase-freies Wasser zu dem Pellet gegeben und für zehn Minuten bei 55-60°C inkubiert.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (Eppendorf Bio Photometer) gemessen, wobei die Extinktion bei 260nm liegt und die Qualität der RNA durch den Quotienten 260/240nm bestimmt wurde. Die RNA-Proben wurden dann bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.6.2. RNA-Isolierung über Silikat-Säulen

Da die Ausbeute an RNA aus den gereinigten Blutproben mit o.g. jedoch für eine RT-PCR nicht ausreichte, wurde nach Aufarbeitung der Blutproben eine andere Methode zur RNA-Extraktion verwendet. Hierzu wurde ein kommerziell erhältliches Kit (RNeasy[®] Mini Kit, Mini Spin Column, Mat. No. 1017974, Qiagen GmbH) verwendet, mit welchem in anderen Arbeitsgruppen des Chirurgischen Forschungslabors gute Erfahrungen gemacht wurden. Das System beruht darauf, dass die durch Alkohol dehydrierte RNA an eine Silikatmembran in einer Säule bindet, während DNA und Proteine diese Membran passieren können. Die an der Säule gebundene RNA kann dann mit RNase-freiem Wasser eluiert werden.

Die eingefrorenen Proben wurden zunächst im Wasserbad bei 25° C für ca. zehn Minuten aufgetaut. Zu jeder Probe wurde 600µl 70%-iges Ethanol gegeben und durch Auf – und Abpipettieren vorsichtig vermischt. Dadurch wurde der RNA die Hydrathülle entzogen, was die Voraussetzung für eine Bindung an die Säule ist. Auf die vorbereiteten Säulen wurden jeweils 700µl des Probengemisches aufgetragen und 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die über die Säule zentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und der Rest der Probe erneut auf die Säule aufgetragen, ebenfalls zentrifugiert und der Rest wieder verworfen. Nun wurde zur Aufreinigung 350µl RW1 Waschlösung (RW1 Buffer; Mat. No 1014567, Qiagen GmbH) auf die Säulen gegeben und für 15 Sekunden zentrifugiert.

Um eventuell an der Säule haftende DNA, die später die Ergebnisse stören würde, zu eliminieren, wurde ein DNA-Verdau mit dem Enzym DNase I (RNase-Free DNase Set, Cat. No. 79254, Qiagen GmbH) durchgeführt. Dafür wurde die gefriergetrocknete DNase in 550µl RNase-freiem Wasser gelöst und mit einer Pipette vorsichtig gemischt. Die 550µl wurden aliquotiert und in Portionen von 60µl in einem sterilen 1,5ml Eppendorfgefäß bei –20°C eingefroren. Pro Probe wurden dann zum DNA-Verdau 10µl der DNase mit 70µl RDD Puffer (RDD Buffer, DNA Digest Buffer, Lot. No. 11863398, Qiagen GmbH) durch Auf- und Abpipettieren vermischt und auf die Säulen möglichst genau in die Mitte pipettiert und für 15 Minuten inkubiert.

Nach dem DNase-Verdau wurden die Säulen nochmals mit 350µl RW1 Puffer gewaschen und 15 Sekunden zentrifugiert, dann erhielt jede Säule einen neuen Deckel, um Rückstände der DNase zu vermeiden. Nun wurden die Säulen zweimal mit 500µl eines anderen Puffer (RPE Buffer aus dem RNeasy[®] Mini Kit) erneut gewaschen und das erste Mal für 15 Sekunden, das zweite Mal für zwei Minuten zentrifugiert, um die Membran in der Säule zu trocknen. Jede Säule erhielt nochmals einen neuen Deckel und wurde dann eine Minute bei 12.500 rpm zentrifugiert, um alle Rückstände des Waschpuffers zu entfernen. Nun wurden die Säulen in die endgültigen Röhrchen gesteckt und die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert, indem zuerst 50µl, dann nochmals 30µl Wasser auf die Säulen gegeben wurde und je eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die gewonnene RNA photometrisch gemessen (Eppendorf Bio Photometer) und schließlich bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung kryokonserviert.

2.7. cDNA-Synthese

Für die RT-PCR muss die gewonnene RNA zuerst in einer reversen Transkription in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben werden. Dies geschah mit Hilfe der AMV-Reversen-Transkriptase, einem viralen Enzym. Die verwendeten Primer zur cDNA-Synthese waren nicht genspezifisch, sondern sogenannte Random-Hexamere, das heißt sechs Basen-lange Oligonukleotide, deren Sequenz rein zufällig zusammengesetzt ist und die an komplementäre Stellen verteilt über die gesamte RNA binden können. Es wurde bei diesen, sowie bei allen folgenden Schritten, streng darauf geachtet, jede mögliche Kontamination zu vermeiden. Dazu wurde der Arbeitsplatz und alle Materialien vor Beginn der Arbeiten stets mit einer Lösung zur Dekontamination von DNA, RNA und vor allem von RNase behandelt.

Für die Reaktion verwendeten wir eine Konzentration von 500ng RNA in 10µl Probenlösung, da wir hierdurch die beste Ausbeute an cDNA erzielten.

Um die gleiche Konzentration bei allen Proben zu erhalten, wurden die RNA-Proben je nach ihrer Konzentration an RNA entweder mit RNase-freiem Wasser entsprechend verdünnt oder in einer Vakuum-Zentrifuge eingedampft. Alle Reagenzien für die Reverse Transkription waren aus einem kommerziell erhältlichen

Material und Methoden

CK20 RT-PCR Kit (Light Cycler CK20 Quantification Kit, Roche, Cat. No. 3118835). Der Reaktionsmix enthielt pro Probe 4µl RT-Reaction Mix (1x), 2µl dNTP-Mix, in dem zu gleichen Teilen dATP, dCTP, dGTP und dTTP enthalten waren, 2µl steriles RNase-freies Wasser, 1µl Random Hexamers (0,1 A₂₆₀) und 1µl AMV- Reverse-Transkriptase (25 units/µl).

Da diese Mengen alle so gering sind und ein zu großer Fehler entstünde, würde man jede Probe einzeln mit den genannten Reagenzien versetzen, wurden die Mengen jeweils mit der Anzahl der Proben multipliziert und eine größere Menge („Master-Mix“) an Reaktionslösung in einem sterilem 1,5ml Eppendorfgefäß hergestellt. Zur Negativkontrolle für die spätere PCR wurde stets bei einer Probe Aqua ad inj. anstatt RNA eingesetzt. Als Positivprobe wurde für die PCR reine CK-20 RNA (Calibrator-RNA) verwendet. Um die Reverse Transkription zu ermöglichen, müssen die RNA-Proben, bevor die Reaktionslösung hinzugegeben wird, erst 15 Minuten bei 65° C denaturiert werden. Dazu wurden die 10µl Proben in ein kleines PCR-Gefäß gegeben und im PCR-Apparat (MJ Research, PTC-200, Biozym Diagnostik GmbH, Oldenburg) denaturiert. Während der Denaturierung lösten sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Stellen in den RNA-Stücken, somit wurde eine Bindung der Primer erst möglich gemacht. Um die Bildung von Kondensstropfen in den Gefäßen zu verhindern, wurde die Denaturierung sowie auch alle anderen Reaktionen im PCR-Apparat mit beheiztem Deckel durchgeführt.

Nach der Denaturierung wurden die Proben fünf Minuten auf Eis inkubiert, um zu verhindern, dass sich entsprechende Wasserstoffbrückenbindungen wieder ausbildeten. Zu der 10µl RNA-Lösung wurden nun jeweils 10µl der Reaktionslösung dazugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt.

Die eigentliche Reverse Transkription im PCR-Apparat lief folgendermaßen ab: Als erstes wurde eine Bindung der Primer an die RNA vorgenommen, dieses geschah in der sogenannten Annealing-Phase zehn Minuten bei 25°C. Darauf folgte die Reverse Transkription, die Umschreibung der RNA in cDNA, welche dadurch komplementär zur ursprünglichen RNA-Sequenz war. Die Reverse Transkription lief 60 Minuten lang bei 42°C ab. Anschließend wurde in einer Inaktivierungsphase fünf Minuten lang bei 95°C die Reaktion beendet, indem das Enzym AMV-Reverse-Transkriptase durch

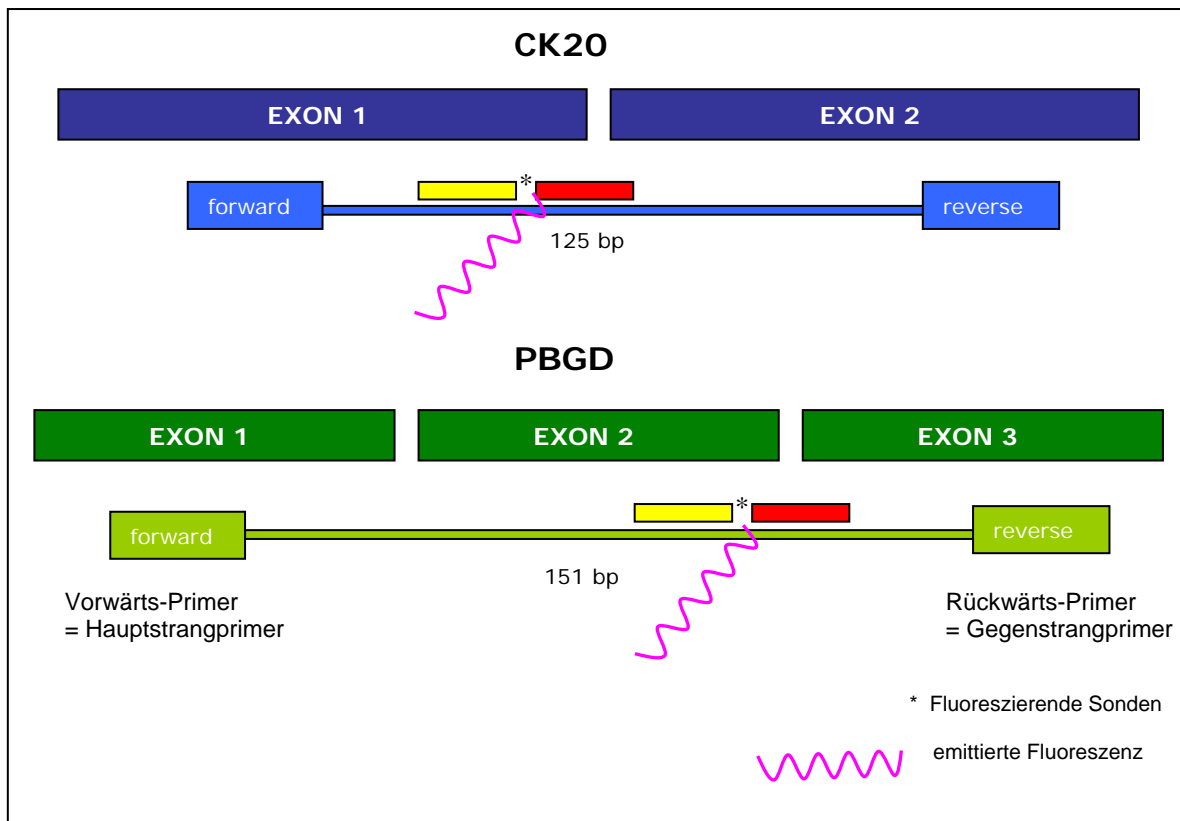
die Hitze denaturiert wurde. Hiermit wurde sichergestellt, dass in späteren Schritten keine unerwünschten Nebenreaktionen abliefen. Die neu synthetisierten cDNA-Proben wurden nach der Reversen Transkription bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.8. Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Die eigentliche Nachweisreaktion war die quantitative CK20-PCR. Die Reaktion beruht darauf, dass von neu synthetisierten DNA-Sequenzen Fluoreszenz emittiert wird, die dann nach jedem Zyklus gemessen werden kann. Diese Fluoreszenz kann entweder von unspezifischen Farbstoffen, die in doppelsträngige DNA interkalieren (z.B. SYBR-Green) oder von genspezifischen fluoreszierenden Sonden ausgehen. Durch die Messung der Fluoreszenz während der Reaktion - daher auch der Name Echtzeit-PCR - wird eine exponentielle Kurve erstellt, welche die Menge an amplifizierter DNA darstellt.

In dem verwendeten Kit (Light Cycler CK20 Quantification Kit, Roche, Cat. No. 3118835) wurden genspezifische Sonden verwendet, das heißt, jeweils zwei Sonden lagern sich an ein jeweiliges Zielgen beziehungsweise Genprodukt, an. Die erste Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit „Light Cycler-Red 640“ gekoppelt und an ihrem 3'-Ende phosphoryliert, um eine ungewollte Verlängerung durch die DNA-Polymerase zu verhindern. Die zweite Sonde ist an ihrem 3'-Ende mit Fluorescein gekoppelt. Nur bei Anlagerung an das spezifische PCR-Produkt kommen sich die beiden Sonden nahe genug, um nach Anregung mittels Laser-Licht gegenseitig Elektronen auszutauschen und hierdurch ein Fluoreszenzsignal auszusenden, welches dann gemessen werden kann (s. Abb. 4).

Diese Methode der Messung der Anzahl der Genamplifikate hat den Vorteil einer höheren Spezifität gegenüber unspezifischen interkalierenden Farbstoffen.



**Abbildung 4:
Primerdesign**

Verwendung exonübergreifender Primerpositionen, hierdurch Vermeidung einer Amplifikation von genomischer DNA

Durch Anlagerung der spezifischen Sonden Fluoreszenz-Emission der Genamplifikate

Als Referenzgen verwendeten wir Porphobilinogen-Deaminase (PBGD), welche als Enzym des Zellstoffwechsels in zwei Varianten vorkommt. Die erste Form liegt vor allem in den erythroiden Zellen, die zweite Form, diejenige die wir benutzten, ubiquitär in allen Geweben vor. Die Vorteile der PBGD sind die relativ konstante Expression auf einem niedrigem Niveau (etwa 2×10^5 Kopien pro 250ng von totaler RNA). Zudem sind für die PBGD bisher keine Pseudogene bekannt.

Unser Zielgen war Cytokeratin 20 (CK20). CK20 ist als Intermediär-Filament Bestandteil des Zytoskeletts von epithelialen Zellen. Die Reaktionslösungen für die Real-Time-PCR enthielten pro Probe 11µl steriles RNase-freies Wasser, 2µl eines Enzym-Master Mix, in welchem sich die DNA-Polymerase befand und 2µl eines Detection Mix entweder für PBGD oder CK20, in welchem die genspezifischen Primer und Sonden enthalten waren. Als Reaktionsgefäße wurden spezielle

Material und Methoden

Glaskapillaren (Light Cycler Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, No. 1909330) verwendet, die eine Fluoreszenzmessung ermöglichen. 15µl der Reaktionslösung wurde in die gekühlten Glaskapillaren vorgelegt. Die zugegebenen cDNA-Proben wurden durch sehr vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt und die Glaskapillaren mit einem mitgelieferten Deckel verschlossen. Das Volumen der eingesetzten cDNA-Proben war 5µl, damit betrug das gesamte Volumen für die PCR 20µl.

Die Proben wurden in einem speziellem Zentrifugationsblock (Light Cycler Centrifuge Adapters, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, No. 100312) fünf Minuten auf den Boden der Kapillaren zentrifugiert, und anschließend in das Light Cycler Instrument überführt. Die Real-Time-PCR begann mit einer Denaturationsphase bei 95°C, während der alle Enzyme aus den vorherigen Reaktionen zerstört wurden und doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgelöst wurde. Außerdem wurde die Taq-Polymerase erst bei diesen hohen Temperaturen aktiviert. Die Amplifikationphase selbst, während der die Vervielfältigung der Ziel-DNA stattfand, wurde in drei Phasen unterteilt:

Während der Denaturierung bei 95°C trennten sich die beiden kongruenten DNA-Stränge und es entstanden zwei DNA-Einzelstränge, die nicht mehr durch die Wasserstoffbrücken miteinander verbunden waren. In der folgenden Anlagerungsphase („Annealing“) bei 60°C lagerten sich die Primer an die jeweils passende Stelle an den Einzelsträngen der DNA an und bildeten somit den Anfang des neu zu synthetisierenden Genabschnitts. An die Primer lagerten sich während der Elongation bei 72°C dann die Taq-Polymerase an und amplifizierten den entsprechenden Genabschnitt in 3´-Richtung. Die emittierte Fluoreszenz wurde nach der Primeranlagerung und vor der Elongationsphase gemessen. Zu diesem Zeitpunkt lagerten sich die genspezifischen Sonden an ihren Zielabschnitt an und konnten sich gegenseitig zur Fluoreszenzemission stimulieren. Nach 45 Cycles wurde das Programm durch Abkühlen auf 40°C beendet und die Proben konnten entnommen werden (s. Abb. 5).

Programm	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Temperaturanstieg (°C/sec)
Denaturation	1	95	600	20
Amplifikation	50			
Denaturation		95	10	20
Annealing		60	10	20
Elongation		72	5	20
Cooling	1	40	30	20

Tabelle 4:
Light Cycler-Programm: Temperatureinstellungen der einzelnen Phasen während der Echtzeit-PCR

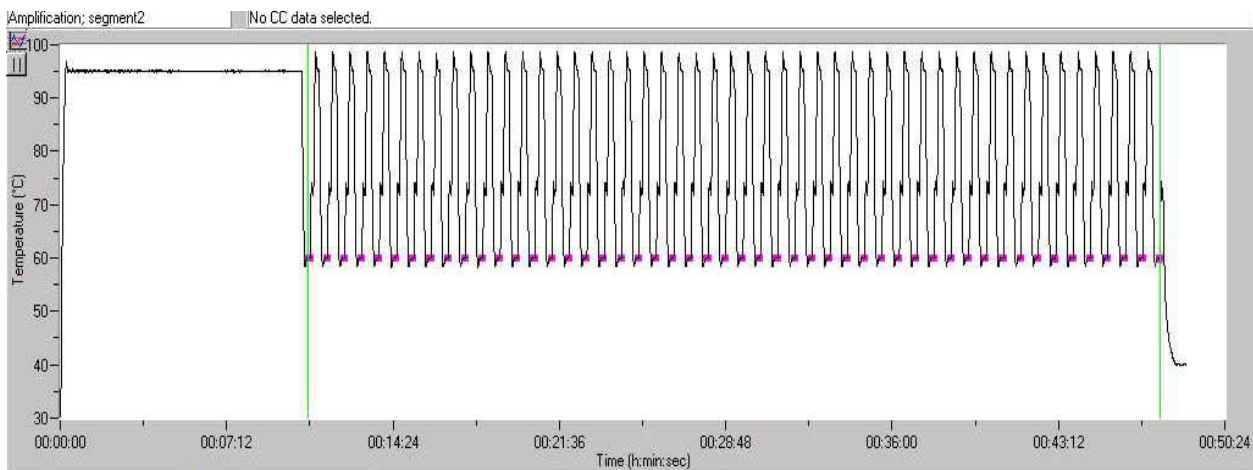


Abbildung 5:
Temperaturkurve während der Echtzeit-PCR im Light Cycler:
 Fluoreszenzmessung während der kurzen Annealing-Phasen bei 60° (violett angefarbt)

3. Ergebnisse

3.1. Phenol-Chloroform aufgearbeitete Proben

Für die ersten 9 Proben wurde zur RNA-Extraktion die Chomczynski-Methode (siehe 2.6.1) verwendet, da dies ein in der Literatur immer wieder beschriebenes Verfahren zur Isolierung der RNA mit nachfolgender PCR darstellte. Mit diesem Verfahren konnte photometrisch nachweisbar RNA aus unseren Proben extrahiert werden, die Konzentration und die Qualität der RNA, welche photometrisch bestimmt wurde, war jedoch für eine RT-PCR nicht ausreichend. So konnte in der RT-PCR nur in wenigen Proben überhaupt das Referenz-Gen PBGD in sehr geringen Mengen und in keiner der Proben CK-20 nachgewiesen werden.

Selbst nachdem die Menge der eingesetzten cDNA pro Probe auf 1µg verdoppelt wurde, konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden. Da jedoch die mitgelieferten Positivproben des PCR-Kits zur Kontrolle der cDNA-Synthese und der PCR stets regelrecht ausfielen, musste davon ausgegangen werden, dass das Problem nicht in der cDNA-Synthese oder der PCR lag, sondern an der RNA, d. h. dass entweder nicht genügend RNA für die Reaktion in den Proben zur Verfügung stand, oder bestimmte Reagenzien der verschiedenen Reaktionen nicht kompatibel waren. Es war daher der notwendige und sinnvolle Schritt, eine andere Methode zur RNA-Extraktion für alle weiteren Proben zu verwenden (siehe 2.6.2).

3.2. Negativkontrollen

Das Blut von insgesamt 15 gesunden, weder vor noch nach dem Zeitpunkt der Blutabnahme an einem Krebsleiden erkrankten Personen, wurde untersucht zur Frage nach der Spezifität der Methode. Bei allen 15 getesteten Proben wurde ein eindeutig negatives Ergebnis im Sinne einer nicht vorhandenen Expression von CK20 in der quantitativen RT-PCR erzielt. Selbst nach einer hohen Anzahl von Zyklen (45 Zyklen) gab es keinen Nachweis einer falsch positiven Probe.

Das Referenzgen PBGD wurde in allen Proben auf gleichem Niveau regelrecht nachgewiesen. Somit wurde gezeigt, dass in der ursprünglichen Probe auch sicher mononukleäre Zellen vorhanden gewesen waren, des weiteren, dass die Qualität der RNA und nachfolgend der cDNA gut und homogen war. In jedem Lauf des Light Cycler-Gerätes wurde ebenso stets eine interne Kontrolle mitgeführt, d. h. sowohl eine standardisierte Positivkontrolle für CK20, welche im RT-PCR-Kit für CK20 mitgeliefert wurde, als auch eine Probe mit purem Aqua dest.

Die Probendurchgänge im Light Cycler-Gerät wurden schließlich nur dann ausgewertet, wenn sowohl die RT-PCR-Negativkontrolle (mit reinem Aqua dest.) negativ war, als auch die Positivkontrolle eindeutig positiv ausfiel, so dass von validen Ergebnissen ausgegangen werden konnte. Die folgende Abbildung zeigt ein Ergebnisprotokoll eines Laufes mit Negativkontrollen aus dem Light Cycler: Dabei ist auf der Abszisse (x-Achse) die Anzahl der Zyklen im Light Cycler aufgetragen, auf der Ordinate (y-Achse) die gemessene Fluoreszenzstärke der jeweiligen Proben.

Daraus ergeben sich die Kurven, aus denen sich mehrere Punkte schließen lassen: Der Punkt, an dem die Kurve beginnt, exponentiell zu steigen, heißt Crossing Point. Je höher die Ausgangskonzentration an Substrat (in unserem Fall an CK20- oder PBGD-cDNA) ist, desto früher ist auch der „Crossing Point“. Ein Abstand von drei Zyklen entspricht in etwa einer Zehnerpotenz in der Ausgangskonzentration. Um die Kurven eindeutig bestimmten Probennummern zuordnen zu können, gibt es eine Liste, die jeder Probennummer jeweils eine bestimmte Farbe der Kurve zuordnet (Liste ist hier nicht abgebildet).

Ergebnisse

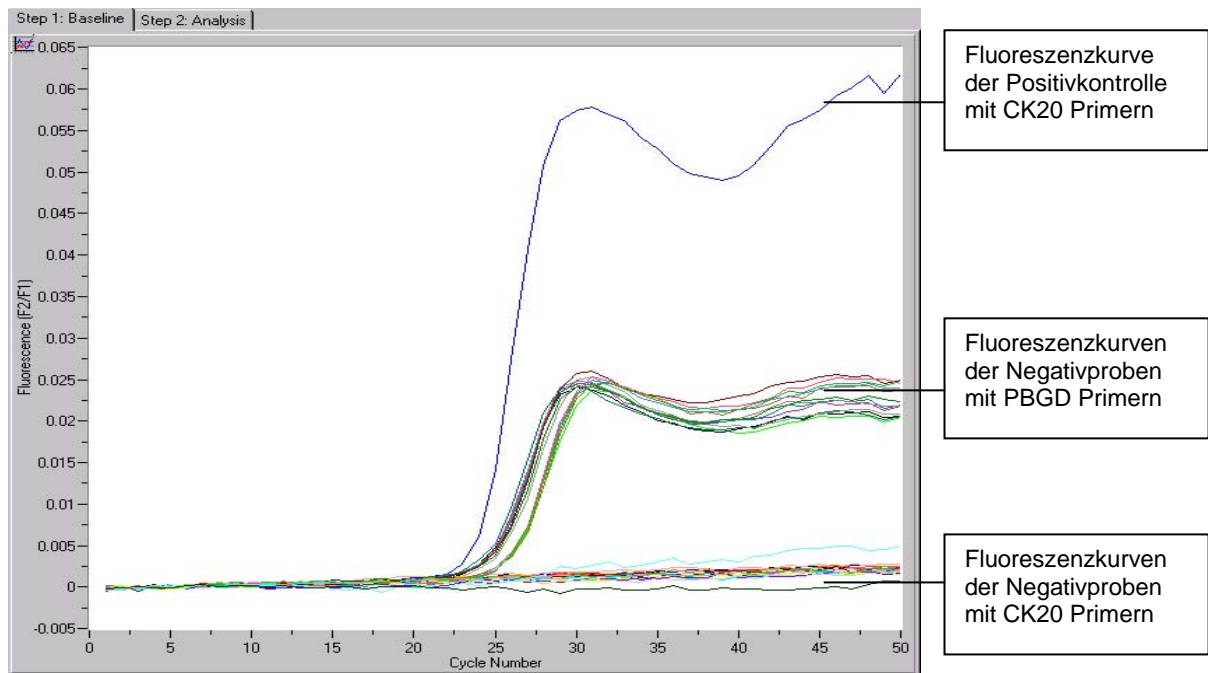


Abbildung 6:

Ergebnisse der Negativkontrollen: Es liegt eine regelrechte Expression des Referenzgens PBGD, eine regelrechte Expression des Zielgens CK20 in der Positivkontrolle und kein Nachweis von CK20 in den Kontrollproben von gesunden Probanden vor
x-Achse: Anzahl der Zyklen im Light Cycler-Gerät
y-Achse: gemessene Fluoreszenzstärke der Proben

Es wurden keinerlei Anzeichen einer irregulären Hintergrundexpression von CK20 in den Proben der gesunden Personen gefunden.

3.3. Positivkontrollen

Um die Nachweisgrenze der Methode zu überprüfen, d. h. wieviele Tumorzellen pro Milliliter Blut zu einem positiven Testergebnis führen, wurden die hergestellten Positivkontrollen mit jeweils 5, 10, 100 und 1000 HT29-Zellen in 10ml EDTA-Blut von gesunden Spendern sowie eine verdünnte Zellsuspension mit 1 Mio. HT29-Zellen pro Milliliter Blut verwendet. Das Ergebnis war folgendes:

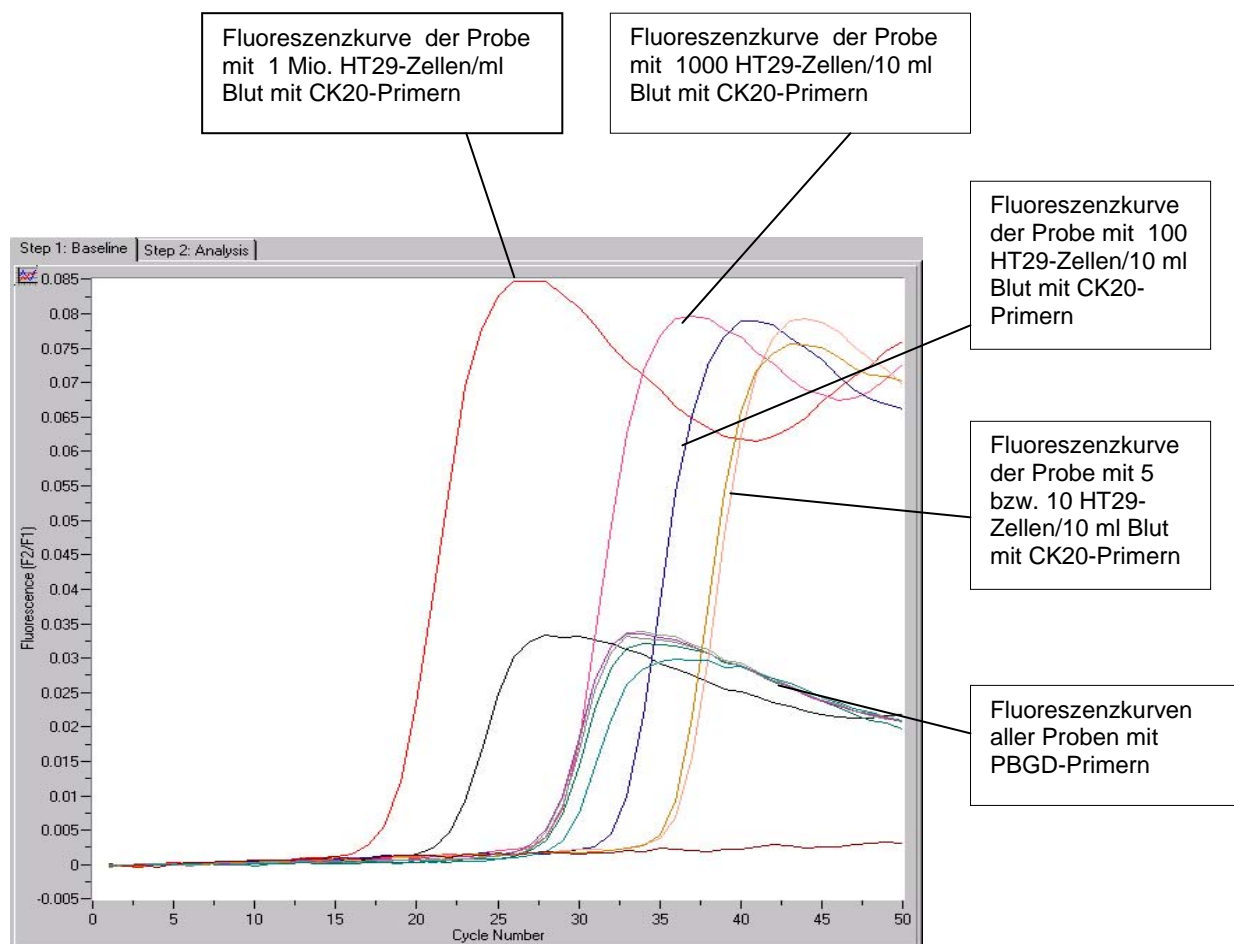


Abbildung 7:

Ergebnisse der Positivkontrollen: Es liegt eine regelrechte Expression des Referenzgens PBGD und eine konzentrationsabhängige Expression des Zielgens CK20 in den hergestellten Positivproben vor
x-Achse: Anzahl der Zyklen im Light Cycler-Gerät
y-Achse: gemessene Fluoreszenzstärke der Proben

Ergebnisse

Aus den Kurven lässt sich ablesen, dass eine CK20-Expression in allen Positivkontrollen festgestellt wurde. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass ein positiver Nachweis von 5-10 Tumorzellen in zehn Milliliter Blut sicher möglich ist.

3.4. Patientenproben

Es wurden insgesamt 6 positive Ergebnisse für CK20 festgestellt, in drei der präoperativen sowie drei der postoperativen Proben war CK20 nachweisbar. Davon waren bei zwei Patienten (Nr. 9 und Nr.11) sowohl die präoperative als auch die postoperative Probe positiv (Tabelle 5).

Patient Nr.	Geschlecht	Alter	pT-Stadium	pN-Stadium	pM-Stadium	Grading	CK20-Transkripte prä-op	CK20-Transkripte post-op
1	m	63	T3	N0	M0	G1	-	-
2	w	66	T1	N0	M0	G2	-	-
3	m	77	T1	N0	M0	G2	-	-
4	m	79	T2	N0	M0	G2	-	-
5	w	81	T3	N0	M0	G2	-	-
6	m	67	T3	N0	M0	G2	-	-
7	m	73	T3	N0	M1	G2	-	-
8	w	77	T3	N1	M0	G2	-	-
9	w	65	T3	N2	M1	G2	+	+
10	m	57	T3	N2	M1	G2	-	-
11	w	82	T2	N0	M0	G3	+	+
12	w	52	T3	N0	M0	G3	-	-
13	m	72	T3	N0	M0	G3	-	-
14	m	68	T3	N2	M1	G3	-	-
15	m	72	T1	N0	M0	G1	-	-
16	m	55	T1	N0	M0	G3	-	-
17	m	73	T1	N1	M0	G3	-	-
18	w	65	T2	N1	M1	G3	-	-
19	w	66	T4	N1	M1	G3	+	-
20	m	64	T4	N1	M0	G3	-	-
21	w	73	T2	N2	M0	G3	-	+
22	m	50	T3	N0	M0	G3	-	-

Tabelle 5:

Ergebnisse der Patientenproben:

Die Tabelle enthält die Rohdaten. Zusätzlich zu Alter und Geschlecht der Patienten sind das pTNM-Stadium sowie das Grading mit angegeben

Ergebnisse

Pat. Nr. 9 war eine 65-jährige Frau mit einem kolorektalen Karzinom im Stadium T3N2M1 (Metastase in der Leber). Bei ihr wurde sowohl prä- als auch post-op CK20-positive Zellen im zentralvenösen Blut nachgewiesen. Ebenso war bei Pat. Nr. 11, einer 82-jährigen Frau, mit einem T2N0M0-Tumor der Nachweis von Tumorzellen sowohl prä- als auch postoperativ positiv, bei dieser Patientin in einem eher frühen Stadium der Erkrankung, in der eine hämatogene Disseminierung für den weiteren Verlauf eine bedeutend größere Rolle spielt.

Bei Pat. Nr. 19, einer 66-jährigen Frau mit einem Magen-Karzinom im Stadium T4N1M0 enthielt nur die präoperative Probe CK20-Zellen. Im Gegensatz dazu waren bei Pat. Nr. 21, einer 73-jährigen Frau mit einem T2N2M0 Magenkarzinom nur in der postoperativen Probe CK20-Zellen nachweisbar.

Der Vergleich des Nachweises von CK20-positiven Zellen im zentralvenösen Blut mit den klinisch-pathologischen Patientenparametern zeigte, daß hier kein statistisch signifikanter Zusammenhang bestand (Tabelle 5). Im Detail wurde Tumorgroße, Lymphknotenbefall, Fernmetastasen, Grading, Tumorentität, sowie Alter und Geschlecht der Patienten mit dem Nachweis von CK20-positiven Zellen verglichen. Das Patientengut von 22 Patienten bestand aus 9 weiblichen und 13 männlichen Patienten, der Altersmedian betrug 68 Jahre (50J.-82J.).

Weiterhin gab es in dem Patientengut 9 Patienten mit T1/T2-Tumoren und 13 Patienten mit T3/T4-Tumoren. 13 Patienten hatten tumorfreie Lymphknoten (N0), 9 Patienten hatten ein Stadium von N1 oder N2, eine Fernmetastastierung war bei 6 der Patienten präoperativ nachgewiesen worden und die Operation aus palliativen Gründen vorgenommen worden. 7 der Patienten waren an einem Magenkarzinom erkrankt, 14 an einem kolorektalen Karzinom und ein Patient an einem Ösophaguskarzinom. Alle Karzinome waren histologisch Adenokarzinome mit unterschiedlicher Differenzierung (Tabelle 6).

Ergebnisse

Variable	Anzahl der Patienten	CK 20-positive Zellen prä-op	CK20-positive Zellen post-op	p-Wert* prä-op	p-Wert* post-op
Total	22	3 (13,6%)	3 (13,6%)		
Tumorgröße				1,00	0,544
pT1-pT2	9	1 (11,1%)	2 (22,2%)		
pT3-pT4	13	2 (15,4%)	1 (7,7%)		
Lymphknotenbefall				0,544	0,544
pN0	13	1 (7,7%)	1 (7,7%)		
pN1-pN2	9	2 (22,2%)	2 (22,2%)		
Metastasen				0,155	1,00
M0	16	1 (6,3%)	2 (12,5%)		
M1	6	2 (33%)	1 (17%)		
Grading				1,00	1,00
G1-2	11	1 (9,1%)	1 (9,1%)		
G3	11	2 (18,2%)	2 (18,2%)		
Tumor Typ				1,00	1,00
Magen	7	1 (14%)	1 (14%)		
Kolorektal	14	2 (14%)	2 (14%)		
Ösophagus	1	0 (0%)	0 (0%)		
Alter				1,00	1,00
<68 Jahre	11	2 (18%)	1 (9%)		
≥68 Jahre	11	1 (9%)	2 (18%)		
Geschlecht				0,059	0,059
weiblich	9	3 (33%)	3 (33%)		
männlich	13	0 (0%)	0 (0%)		

Tabelle 6:

Ergebnisse der Patientenproben aufgeschlüsselt nach verschiedenen Parametern

* p-Werte: berechnet mittels 2-seitigem Fisher-Test

Die Nachweisrate insgesamt von CK20-positiven Zellen in den Patientenproben betrug 13,6% (6/44). Von den analysierten 22 präoperativen und 22 postoperativen Proben waren jeweils drei Proben positiv, die Gesamtnachweisrate präoperativ sowie postoperativ unterscheidet sich daher nicht (Abbildung 8).

Ergebnisse

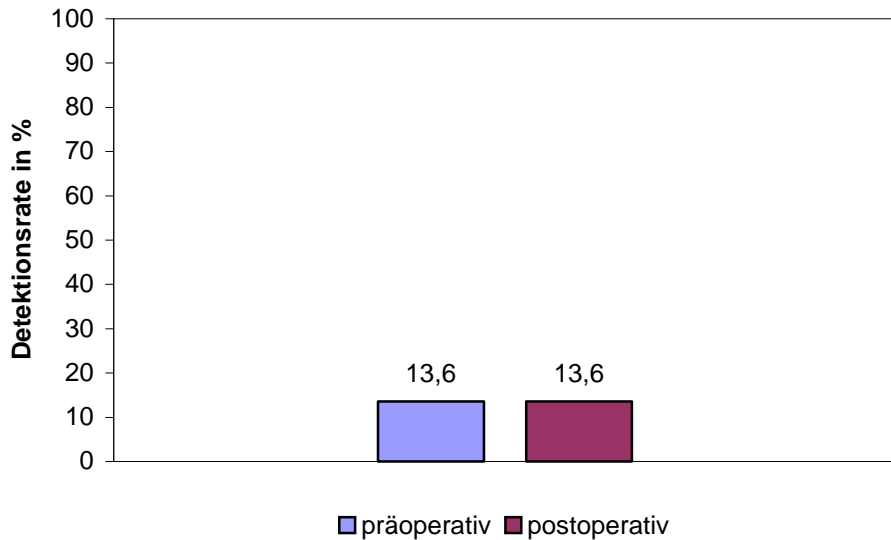


Abbildung 8:
Detektionsrate von CK20-positiven Zellen in präoperativen und in postoperativen Blutproben

Betrachtet man die Nachweisrate von CK20-positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Tumorbefall der Lymphknoten, so zeigt sich eine gewisse Tendenz; unter Patienten ohne Lymphknotenbefall fanden sich bei 7,7% der Patienten CK20-positive Zellen, dagegen bei den Patienten mit Lymphknotenbeteiligung in 22,2% der Fälle ($p=0,54$; Fisher-Test; Abbildung 9).

Hierbei bestand kein Unterschied zwischen präoperativer und postoperativer Blutentnahme.

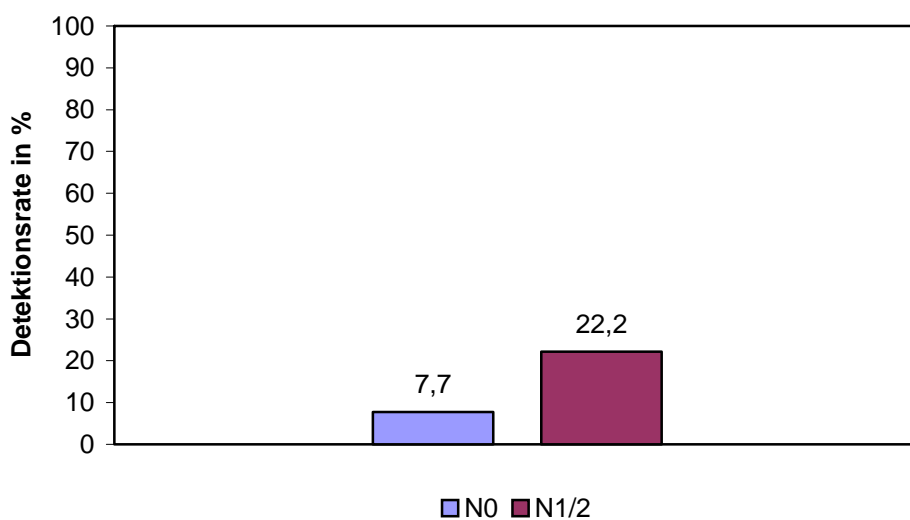


Abbildung 9:
Detektionsrate von CK20-positiven Zellen in den Blutproben aufgeschlüsselt nach Lymphknotenbefall

Ergebnisse

Tendenziell fanden sich bei Patienten mit Fernmetastasen (M1) sowohl präoperativ als auch postoperativ häufiger CK-positive Zellen im zentralvenösen Blut als bei Patienten ohne Fernmetastasen (M0). Hier wurde präoperativ bei Patienten ohne Metastasen in 6,3% CK20-positive Zellen in den Blutproben nachgewiesen, demgegenüber bei Patienten mit Fernmetastasen in 33% der Blutproben. Postoperativ wurden bei den Blutproben der M0-Patienten in 12,5% CK20-positive Zellen gefunden, bei den Blutproben der M1-Patienten in 17% der Blutproben (Abbildung 10).

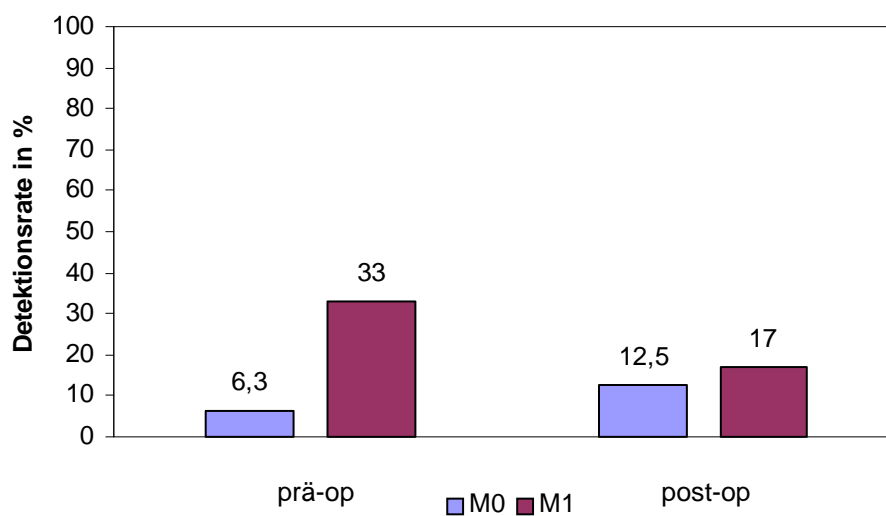


Abbildung 10:
Detektionsrate von CK20-positiven Zellen in den Blutproben bei Patienten ohne Metastasen (M0) verglichen mit Patienten mit Metastasen (M1): links präoperativ, rechts postoperativ

Eine Tendenz ergibt sich auch, wenn man die verschiedenen Differenzierungsgrade der Tumoren aufzeigt. Bei den gut bis mäßig differenzierten Tumoren (G1 und G2) ergab sich bei 9,1% der Blutproben der Nachweis CK20-positiver Zellen, im Vergleich dazu bei den schlecht differenzierten Tumoren bei 18,2% der Blutproben (Abbildung 11).

Ergebnisse

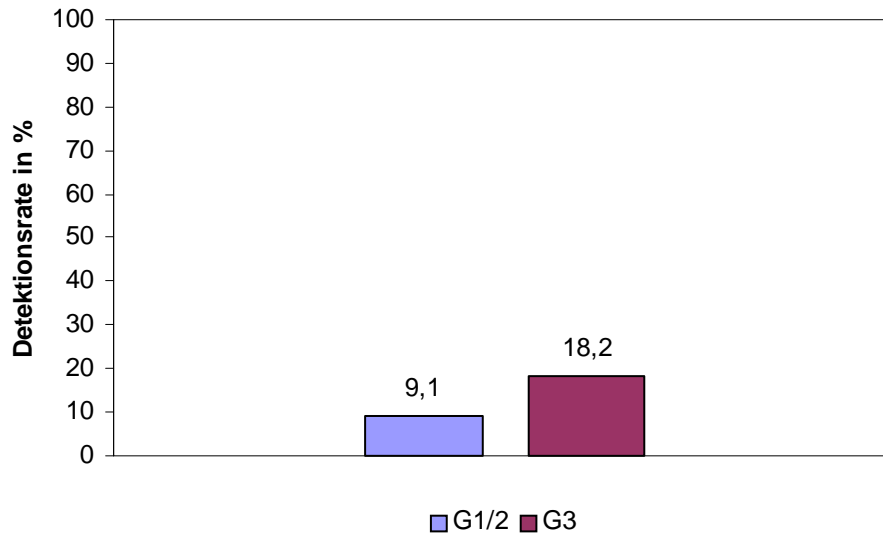


Abbildung 11:
Detektionsrate von CK20-positiven Zellen in den Blutproben der Patienten aufgeschlüsselt nach dem Differenzierungsgrad der Tumoren

Zu der Frage nach einer absoluten oder relativen Quantifizierung der positiven Ergebnisse zeigte sich, dass eine solche in der vorliegenden Arbeit nicht sinnvoll sei. Erstens gab es keine Hintergrundexpression in den Negativkontrollen, wir waren daher nicht gezwungen, eine cut-off-line zu setzen, d. h. dass ab einer bestimmten Anzahl von Zyklen ein positives Signal einer CK20-Expression einer Probe als unspezifisch und somit als negativ gewertet wird. Wir hatten somit entweder nur rein positive Ergebnisse (bei ansteigender Fluoreszenzkurve), oder rein negative Ergebnisse (bei fehlendem Anstieg der Fluoreszenzkurve). Zudem interessierte in dieser Arbeit primär die Frage, ob eine Probe überhaupt positiv oder negativ sei.

Es lässt sich darüber streiten, ob es Sinn macht, die positiven Ergebnisse quantitativ untereinander zu vergleichen, um einen Rückschluss auf eine eventuelle Tumorzellanzahl in der Probe zu ziehen, da es noch nicht geklärt ist, ob disseminierte Tumorzellen zu jeder Zeit ein konstantes Expressionslevel von CK20 – Transkripten aufweisen. Somit wäre eine Berechnung, welche von der Anzahl der Kopien von CK20 auf eine Anzahl von Tumorzellen schließen würde, wahrscheinlich ungenau.

Ergebnisse

Auf Doppelbestimmungen wurde verzichtet, nachdem anfangs bei wiederholter Analyse in allen untersuchten Proben eine fast identische Messung erzielt wurde. Die prozentuale Abweichung der crossing points betrug durchschnittlich 0,99% (zwischen 0,97% und 1,01%). Angesichts dieser Ergebnisse war es nicht unbedingt notwendig, Doppelbestimmungen im Light Cycler durchzuführen.

4. Diskussion

Dies ist die erste Studie, die prä- und postoperativ dichtegradient-aufgereinigte zentralvenöse Blutproben von Patienten mit operablen gastro-intestinalen Tumoren mittels quantitativer CK20 RT-PCR untersucht. Die Ziele von RT-PCR Assays zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen schließen mehrere Punkte ein: das Auffinden von Patientensubgruppen mit einem erhöhten Risiko für eine Entwicklung einer hämatogenen Metastasierung, eine Beobachtung der zirkulierenden Tumorzelllast und der Antigenexpression disseminierter Tumorzellen. Ziel dieser Studie war die Etablierung und Evaluation dieser Methode hinsichtlich einer sinnvollen Anwendbarkeit für Blutproben von Patienten mit gastro-intestinalen Karzinomen.

4.1. Bewertung der Methode

4.1.1. Bewertung der Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Ergebnisse der mittels Chomzcynski-Methode (11) aufgearbeiteten Proben waren nicht verwertbar. Diese Methode wurde zwar mit Erfolg in anderen Arbeiten verwendet (26,57), jedoch wurde in diesen Arbeiten keine darauffolgende Real-Time-PCR verwendet, sondern ein standardmäßiger Nachweis der nested-PCR-Produkte in Agarose-Gel. Trotzdem wurde vor Beginn dieser Arbeit davon ausgegangen, dass die RNA-Extraktion mittels des Chomzcynski-Reagens Trizol (TRIzol® Reagent, Gibco BRL) geeignet wäre, da in der Literatur auch keine gegenteiligen Veröffentlichungen existierten.

Es zeigte sich jedoch, dass sowohl die Qualität als auch die Menge der gewonnenen RNA erheblich geringer waren als mit der nachfolgend verwendeten Extraktion der RNA über Silikat-Säulen (siehe 2.6.2.). Nach diesen Erfahrungen muss nun festgestellt werden, dass eine RNA-Extraktion mit Phenol-Chloroform in Zusammenhang mit einer weiteren Aufarbeitung der Proben in einer quantitativen Echtzeit-PCR nicht empfohlen werden kann.

4.1.2. Nachweisgrenze und Spezifität im Vergleich mit anderen Arbeiten

Zur Sensitivität der beschriebenen Methode lässt sich sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse den Angaben aus anderen Arbeiten gleichen. In dieser Studie konnte der Nachweis von 5-10 Tumorzellen pro 10ml Vollblut gezeigt werden. Dies entspricht einem Nachweis von einer Tumorzelle in 10^7 peripheren mononukleären Blutzellen, was den maximalen Nachweisgrenzen der in der Literatur beschriebenen Angaben entspricht (36,68). Diese Nachweisgrenze ist jedoch zehnmal höher als bei immunhistochemischen Nachweismethoden (44). Dieses Ergebnis ist nicht auf jede Tumorentität übertragbar, da das Expressionsniveau des Markers eine gewisse Grenze überschreiten muss, damit die disseminierte Tumorzelle nachweisbar ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber, dass es prinzipiell möglich ist, auch eine geringe Anzahl an Tumorzellen im Blut nachzuweisen.

Diese hohe Sensitivität macht es möglich, das Konzept der nested-PCR, welches oft bei der konventionellen RT-PCR benutzt wird, zu verlassen. Diese Methode ist zeitraubend und kann mit einem Verlust an Spezifität aufgrund der Gefahr einer Kontamination einhergehen (6,58). Ein weiterer Vorteil der quantitativen RT-PCR ist die Möglichkeit, Schwankungen der Qualität der RNA und/oder DNA zu erkennen durch eine Quantifikation des Referenzgens und einer nachfolgenden Korrelation der Markerkonzentration zu der Konzentration des Referenzgens (relative Quantifizierung). Wir wählten für unsere Arbeit PBGD als Referenzgen, welches keine bekannten Pseudogene besitzt. Die Expression des Referenzgens in unseren Proben war sehr homogen. Somit ist davon auszugehen, dass falsch-negative Ergebnisse in unserer Studie aufgrund niedriger Qualität der cDNA ausschließbar sind.

Generell ist die Sensitivität und Spezifität einer PCR sehr stark abhängig von einer möglichen Hintergrundexpression des jeweilig verwendeten Markers im Blut. Wir fanden in unserer Arbeit keinen Nachweis einer illegitimen Hintergrundexpression, in der Literatur finden sich jedoch Angaben von falsch-positiven Ergebnissen bei CK20-PCRs die von 0% (65) bis zu 100% (7,60) schwanken. Dies macht dann bei quantitativen Ansätzen das Setzen eines Schwellenwertes nötig, mit Hilfe dessen

Diskussion

eine Hintergrundexpression von richtig positiven Ergebnissen unterschieden werden kann.

Eine große Rolle im Hinblick auf eine mögliche Hintergrundexpression spielen neben der unterschiedlichen Sensitivität von PCR-Ansätzen auch die vorangegangenen Schritte der Probenaufbereitung (Verwendung von Vollblut, Isolation der gesamten weissen Blutzellen durch Lyse der Erythrozyten oder Isolation der mononukleären Zellfraktion durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten). Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse, die eine mögliche Expression von CK20 in mononukleären Zellen und Granulozyten betreffen (60,61), ist die Methode der Wahl in diesem Zusammenhang immer noch nicht endgültig geklärt.

Die vorliegende Arbeit zeigte nun, dass nach Aufreinigung über Dichtegradienten in keiner der 15 Negativproben auch nur eine geringe Hintergrundexpression von CK20 nachweisbar war. Dies bedeutet, dass mit der verwendeten Methode der RT-PCR eine sehr hohe Spezifität erreicht werden kann, was andere Studien nicht erreicht hatten. So haben andere Studien, in welchen RNA aus Vollblut gewonnen wird, d.h. ohne vorhergehende Isolierung einer Zellfraktion, eine weit höhere Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen bzw. Nachweis einer Hintergrundexpression von CK20 in Negativkontrollen (55). Andererseits muss bedacht werden, dass durch die Isolierung der mononukleären Zellfraktion wahrscheinlich auch die Gefahr eines Verlusts an Tumorzellen besteht (33). Bis heute ebenfalls nicht geklärt ist, wie sich etwa Tumorzellaggregate von mehreren zusammengelagerten Tumorzellen während einer Zentrifugation über einen Dichtegradienten verhalten, und ob diese während der Prozedur dann eventuell verloren gehen. Bei diesem Problem könnte jedoch eine Anreicherung von Tumorzellen durch Magnetpartikel, welche seit einiger Zeit zur Verfügung stehen, von Nutzen sein (22,47). Jedoch zeigte ein Vergleich der beiden Methoden (36), d. h. die Analyse von Proben auf CK20-Transskripte einerseits nach einer Anreicherung der Tumorzellen durch Magnetpartikel und andererseits nach Zentrifugation über einen Dichtegradienten, keinerlei Unterschied im Hinblick auf Sensitivität oder Spezifität. Ein Unterschied der Nachweisrate war lediglich zu den Proben feststellbar, die zuvor weder dem einen noch dem anderen der beiden Verfahren unterzogen worden waren.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit der hier beschriebenen Methode sowohl eine sehr hohe Sensitivität mit dem Nachweis einer Tumorzelle in 2ml Vollblut, als auch eine sehr gute Spezifität mit keiner einzigen falsch-positiven Probe aus 15 Negativkontrollen erreicht werden konnte. Die Methode an sich hat hiermit den Nachweis ihrer Qualität erbracht und ist sicher den hergebrachten Methoden der RT-PCR mit Nachweis der PCR-Produkte mittels Gel-Elektrophorese sowie der Immunhistochemie vorzuziehen.

4.2. Bewertung der Ergebnisse der Patientenproben im Kontext zur aktuellen Literatur

Die Anzahl der als positiv getesteten Proben war mit 13,6% insgesamt im Vergleich zu anderen publizierten Ergebnissen eher gering. Die Variationsbreite ist jedoch groß, so reichen die Nachweisraten disseminierter Tumorzellen in Blut in verschiedenen Arbeiten von 13,2% (55) bis zu 74% (67). Doch genauso wie die Nachweisraten stark differieren, sind auch die Raten an falsch-positiven Proben unterschiedlich, so haben einige ebenso wie wir keine falsch-positiven Ergebnisse in den Negativkontrollen (16), einige dagegen fanden aber bis zu 10,9% positive Ergebnisse in ihren Negativkontrollen (22) (Tabelle 7). Wohl am ehesten vergleichbar mit dieser Arbeit ist sowohl von der Methodik, als auch von der Ergebnisrate die Studie von Schuster et al., die eine ähnliche Rate an positiven Proben fanden. Schuster et al. verwendeten ebenso eine quantitative RT-PCR, allerdings verarbeitete diese Arbeitsgruppe Vollblut ohne Separieren der mononukleären Zellfraktion. Eventuell kann hierdurch die hohe Anzahl der Negativkontrollen mit einer illegitimen Hintergrundexpression von CK20 erklärt werden. Schuster et al. konnten jedoch dank quantitativer Methodik durch Verwendung eines Schwellenwertes tumorspezifische Transskripte von illegitimen Transkripten unterscheiden.

Diskussion

Tabelle 7:
Nachweisrate und Spezifität von CK20 RT-PCR-Methoden im Vergleich

Studie	positive Patientenproben in %	positive Negativkontrollen in %	verwendete Marker
Funaki <i>et al.</i> (16)	48	0	CK20
Weitz <i>et al.</i> (65)	41	keine Negativkontrollen	CK20
Wyld <i>et al.</i> (68)	48	8,3	CK20
Soeth <i>et al.</i> (57)	17	3,4	CK20
Wharton <i>et al.</i> (67)	74	4,3	CEA *+CK20
Hardingham <i>et al.</i> (22)	20	10,9	CK20
Schuster <i>et al.</i> (55)	13,2	84,6**	CEA *+CK20

* CEA: Karzinoembryonales Antigen

** als „low level-Hintergrundexpression“

Entscheidend ist die Frage nach möglichen Gründen für die geringe Zahl der positiven Proben, nachdem in einigen anderen Gruppen höhere Nachweisraten gefunden wurden. Natürlich können diese Angaben immer in Zweifel gezogen werden im Hinblick auf das oben erwähnte Problem der Sensitivität sowie der Spezifität. So mögen in einigen Arbeiten die hohen Raten der positiven Patientenproben durchaus einen Grund in einer gewissen Rate an falsch-positiven Ergebnissen haben. Dies kann aber sicher nicht der einzige Grund für diesen Widerspruch sein.

Eine häufige Erklärung der niedrigen Raten an positiven Ergebnissen ist die, dass Tumorzellen eventuell diskontinuierlich von dem Primärtumor in die Zirkulation abgegeben werden und/oder dann nicht gleichmäßig verteilt werden (9,30). Diesem Problem könnte man versuchen entgegen zu wirken, indem zu mehreren Zeitpunkten Blutproben abgenommen und untersucht werden. Allerdings ergibt sich hier ein Problem bei Verwendung zentralvenösen Bluts, da die Patienten im Regelfall nur intra- und postoperativ über einen zentralen Venenkatheter verfügen. Die Tumorzellaussaat jedoch tritt am wahrscheinlichsten prä- und intraoperativ auf, solange noch der Primärtumor vorhanden ist. Innerhalb der intraoperativen Zeitspanne ist es durchaus möglich, mehrere Proben zu entnehmen, was in dieser

Diskussion

Arbeit ansatzweise vorgenommen wurde. Ansonsten müsste doch auf peripher-venöses Blut ausgewichen werden, welches neben dem portalvenösen Kreislauf zusätzlich den Lungenkreislauf und den peripheren großen arteriellen Kreislauf durchlaufen hat. In diesem Zusammenhang konnte in einer anderen Studie auch ein Anstieg der Detektionsrate erreicht werden, indem zwei oder mehr periphere Blutproben untersucht wurden (67,69). Ebenso ist oft diskutiert worden, ob eine perioperative Verbreitung von Tumorzellen durch die mechanische Manipulation trotz der weithin angewandten no-touch-Technik der Tumorexstirpation während der Operation stattfindet. Dies hätte sicher weitreichende Folgen im Sinne einer zu überlegenden perioperativen systemischen Therapie.

In der hier untersuchten kleinen Gruppe von 22 Patienten mit den jeweiligen prä- und postoperativen Proben konnten wir einen solchen Trend jedoch nicht feststellen. So ist die Rate an positiven Ergebnissen präoperativ wie postoperativ gleich hoch. Wir können daher nicht die Ergebnisse anderer Gruppen bestätigen, die in ihren Arbeiten auf eine perioperative Tumoraussaat geschlossen haben (64).

In der vorliegenden Arbeit bestand kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis disseminierter Tumorzellen und klinisch-pathologischen Parametern wie der Tumorausdehnung, der Tumorhistologie, dem Lymphknotenstatus und der Fernmetastasierung. Ein ähnliches Ergebnis fanden auch Schuster et al., d. h. keinen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen mit dem Stadium der Tumorerkrankung. Es wäre denkbar, dass große Tumoren häufiger zu einer Disseminierung neigen als kleinere Primärtumoren. Hierfür fand sich in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Hinweis.

Ein weiterer zu diskutierender Punkt betrifft das Expressionniveau des Markers CK20 in Tumoren und Zelllinien. Es muss davon ausgegangen werden, dass eventuell die Anzahl der Tumorzellen, die in der Probe enthalten sind, nicht groß genug sein mag, um einen Nachweis zu ermöglichen. Ebenso ist es aufgrund eines sehr niedrigen Expressionsniveaus des Zielgens in den disseminierten Tumorzellen oder aufgrund der Anwesenheit von niedrig differenzierten Zellklonen, welche den gewebespezifischen Marker überhaupt nicht mehr exprimieren, durchaus denkbar, falsch-negative Ergebnisse der Patientenproben zu erhalten. In anderen Studien (19)

Diskussion

sind unterschiedlich hohe Expressionslevel für verschiedene Tumorgewebe, Zelllinien und Metastasen festgestellt worden. Betrachtet man weiter, dass die Expressionslevel in disseminierten Tumorzellen sich möglicherweise von den Expressionsmustern des Primärtumors unterscheiden (17), könnte ein Ansatz, der mit mehreren Markern gleichzeitig arbeitet, von Vorteil sein (8,19,34). So sollte zudem auch auf eine genügend große Menge an Probenmaterial geachtet werden, um so auch bei einer geringen Anzahl an disseminierten Tumorzellen noch eine Chance zu haben, einige Tumorzellen in der Probe zu finden.

Diese nachgewiesene Heterogenität der Tumorzellen für Expressionsmuster relativiert aber auch jegliche quantitative Korrelation zwischen der nachgewiesenen Konzentration der Marker im Blut und der Tumorzelllast im Blut. Obwohl es sicher eine der wichtigsten Fragen ist, wie hoch genau die Tumorzelllast eines einzelnen Patienten sei, ist aus den oben genannten Gründen eine Quantifizierung eines Nachweises auf der Ebene eines mRNA-Markers sicher nur eine Annäherung. So kann mit der Methode nur ein qualitativ positiver Nachweis von disseminierten Tumorzellen erfolgen, eine quantitative Aussage kann damit nur über die Menge an nachgewiesenen cDNA- (und damit mRNA-) Molekülen getroffen werden.

Nun bleibt ebenso die Frage, ob Blut (zentral- oder periphervenös) ein geeignetes Medium für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen darstellt. Nach Einbruch in das Gefäßsystem können Tumorzellen in der Zirkulation kontinuierlich auftreten (39). Alle soliden Tumoren, die bis jetzt untersucht wurden, streuen Tumorzellen über das Blut, was die Vorstufe für die Bildung von Fernmetastasen darstellt. Zudem wurde in allen klinischen Stadien eine Tumorzelldisseminierung nachgewiesen (50). Durch diese Tatsache eignet sich Blut zu einem breit einsetzbaren Probenmaterial sowie für den Nachweis und die Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen. Blut kann während des gesamten Krankheitsverlaufs als Material in einer minimal-invasiven Weise gewonnen werden und ist damit sicher im Hinblick auf die Patienten und ihre Compliance, in Bezug auf die Verfügbarkeit sowie Durchführbarkeit in der Praxis an erste Stelle zu setzen.

Andererseits jedoch ist auch bekannt, dass in anderen Kompartimenten wie Knochenmark oder Pfortaderblut eine wesentlich höhere Rate an positiven

Diskussion

Ergebnissen gefunden wurde (38). Dies ist wahrscheinlich auf eine höhere Anzahl an Tumorzellen in diesen Kompartimenten zurückzuführen, eine Tumorzellanreicherung im Knochenmark im Sinne einer Filterwirkung des Blutes ist wahrscheinlich. Da im periphervenösen oder zentralvenösen Blut anscheinend eine geringe Tumorzelllast vorliegt, sollten zur Untersuchung dieser Kompartimente maximal-sensitive Methoden - wie in dieser Arbeit - verwendet werden. Trotzdem ist die Zugänglichkeit von Knochenmark verglichen mit Blut weitaus schwieriger. Nachdem die Patientencompliance für wiederholte Knochenmarkspunktionen sehr gering ist, erscheint Knochenmark für eine longitudinale Studie, um disseminierte Tumorzellen im Krankheitsverlauf zu beobachten oder für eine Therapieüberwachung relativ ungeeignet zu sein.

Zudem besteht die Frage bei vielen falsch-positiven Ergebnissen nach dem Problem illegitimer Transkription von CK20 im Knochenmark (14).

Ein weiterer Punkt betrifft die Eignung des Markers CK20 für den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut. Die Frage nach einer konsistenten Expression von CK20 in Tumorzellen kann nach wie vor nicht geklärt werden, da weiterhin von großer Heterogenität der Tumorzellen selbst innerhalb eines Individuums ausgegangen werden muss (2). Trotzdem ist CK20 sicher ein wertvoller Marker, der in einem Großteil an untersuchten gastro-intestinalen Primärtumoren sowie ihren Metastasen gefunden wurde (68). Bis dato gibt es noch keinen anderen Marker, der in dieser Form untersucht und klinisch weltweit in zahlreichen Studien angewandt wurde.

Es kann kein Zweifel daran sein, dass es hier auch von Vorteil zu sein scheint, Studien mit mehreren Markern durchzuführen, was auch schon von wenigen Gruppen gezeigt wurde (12). Da die Wahl eines geeigneten Markergens von entscheidender Bedeutung ist, ist es wichtig, dass weiterhin nach möglichen neuen Markern gesucht werden muss. Es bleibt dennoch abzuwarten, ob andere Marker, wie beispielsweise Gene aus der MAGE-Familie, mit welchen schon erste vielversprechende Studien durchgeführt wurden (34), die Situation verbessern werden. In einer separaten Arbeit wurden schon dieselben Patientenproben wie in dieser Arbeit in einer Echtzeit-PCR auf eine MAGE-Expression untersucht (Dissertation von Matthias Nischwitz).

4.3. Zukunftsperspektiven

Die möglichen Anwendungen eines Nachweises von disseminierten Tumorzellen bei Karzinompatienten in der Praxis sind vielfältig. Es steht inzwischen ausser Frage, dass der Nachweis von disseminierten Tumorzellen bei Karzinompatienten – sei es im Knochenmark oder im Blut - einen unabhängiger Parameter im Hinblick auf den weiteren Verlauf der Krankheit darstellt (27). Dies wurde inzwischen in zahlreichen Studien auch bei gastro-intestinalen Tumoren belegt (32,54). Deshalb muss ernsthaft in Erwägung gezogen werden, den Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen in das bisherige TNM-Stagingsystem miteinzubeziehen, da hierdurch auch die weitere Therapieplanung entscheidend beeinflusst werden sollte (53). Für das Mamma-Karzinom wurden disseminierte Tumorzellen bereits für das Lymphknoten-Staging berücksichtigt (UICC 2003). In diesem Rahmen können auch individualisierte Therapiekonzepte entworfen werden, in welchen die Patienten gemäß ihres persönlichen Risikos einer adjuvanten Therapie zusätzlich zur Operation zugeführt werden können (4).

Ein nächster Punkt betrifft die Tatsache, dass sich einige der Tumorzellen wie oben erwähnt in der G0-Phase befinden, und damit für die herkömmlichen Chemotherapeutika oft nur schwer zugänglich sind. Eine mögliche, inzwischen auch schon in klinischen Studien angewandte Therapiealternative oder -ergänzung ist eine Therapie mit Antikörpern. Ein Beispiel ist hier etwa die Therapie mit Herceptin (Antikörper gegen erbB-2/Her2-neu) bei Mamma-Karzinomen. Ein vollkommen anderer Ansatz für die Nutzung eines Nachweises von disseminierten Tumorzellen stellt das Monitoring einer systemischen Therapie dar. Hier könnte ein Nachweis von disseminierten Tumorzellen während oder nach der Therapie als Indiz für ein Therapieversagen eines Chemotherapeutikums angesehen werden. Hiermit könnten frühzeitig überflüssige Therapien abgebrochen und andere Medikamente eingesetzt werden.

Es gibt zu diesem Punkt bisher nur sehr wenige Daten, aber in einer Studie mit Prostatakarzinom-Patienten wurden in der Gruppe der Patienten mit einem Therapieversagen bei 47% der Patienten disseminierte Tumorzellen im Blut nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden in der Patientengruppe, bei der die

Diskussion

systemische Therapie erfolgreich war, nur bei 3% der Patienten Tumorzellen im Blut nachgewiesen (41). Etwas widersprüchlichere Daten liefert eine andere Studie mit Patienten mit kolorektalem Karzinom, die sich einer Chemotherapie unterzogen (59). All diese Ansätze machen jedoch deutlich, dass der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Blut in Zukunft einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Therapie, als auch auf die Prognose von Karzinompatienten haben wird.

5. Zusammenfassung

Da konventionelle Tumormarker im Verlauf einer Tumorerkrankung zwar Hinweise auf ein Rezidiv der Erkrankung geben können, sie aber erst bei Vorliegen einer schon bedeutenden Tumormasse ansteigen, sind sensitivere Methoden nötig, um so früh wie möglich ein systemisches Stadium der Erkrankung zu identifizieren und dann behandeln zu können. Daher wäre es wichtig, ein diagnostisches Mittel zur Verfügung zu haben, welches erlauben würde, einen permanenten Zugang zum aktuellen Krankheitsgeschehen zu haben. Diese Lücke in der Diagnostik wird durch den Nachweis von einzelnen disseminierten Tumorzellen geschlossen werden, welche die Verbindung zwischen dem Primärtumor und dem späteren Auftreten von Metastasen darstellen. Daher wurde diese Studie initiiert, um erstmals die Nachweisbarkeit von disseminierten Tumorzellen in zentralvenösem Blut nach Isolierung der mononukleären Zellfraktion mittels quantitativer RT-PCR zu untersuchen.

Von 15 gesunden Kontrollprobanden ohne Malignom in ihrer Vorgeschichte wurden je 7,5ml zentralvenöses Blut asserviert und zur Prüfung der Spezifität der Nachweismethode verwendet. Es gab keinen falsch-positiven Nachweis von CK20 in den Negativkontrollen.

Zur Überprüfung der Sensitivität konnte in hergestellten Positivproben mit HT29-Zellen noch ein positiver Nachweis von CK20 bei einer Anzahl von 5 Tumorzellen in 10ml Vollblut erbracht werden.

Von 22 Patienten mit operablem Kolonkarzinom wurden prä- und postoperativ je 7,5ml zentralvenöses Blut gewonnen. Bei 4 der 22 Patienten (bei zwei Patienten sowohl prä-op als auch post-op, bei einem Patienten nur prä-op und bei einem Patienten nur post-op) fand sich ein positiver Nachweis von CK20 entsprechend einer systemischen Disseminierung von Tumorzellen im zentralvenösen Blut. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im zentralvenösen Blut korrelierte nicht mit klinischen Parametern wie dem TNM-Stadium, Grading, Alter oder Geschlecht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die geringe Nachweisrate trotz Verwendung einer höchst sensitiven Methode in dieser Studie jedoch die Eignung

Zusammenfassung

des Kompartiments zentralvenöses Blut für einen Nachweis von disseminierten Tumorzellen bei gastro-intestinalen Karzinomen in Frage stellt. Es kann jedoch noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die geringe Nachweisrate von Tumorzellen ein Problem des Markers, des Detektionssystems selbst oder ein Zeichen für eine diskontinuierliche Tumorzell dissemination ist. Trotzdem kann für die Zukunft sicher nicht ausgeschlossen werden, dass sich durch die Verwendung von neuen und mehreren Markern gleichzeitig, die Situation nicht ändern könnte. Die klinische Relevanz sowie der mögliche Vorteil der Patienten, von einer individuellen Behandlung zu profitieren, ist zweifelsfrei die größte Motivation, weiterhin in diesem hochinteressanten Feld der Medizin zu forschen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahmad,A. & Hart,I.R. *Mechanisms of metastasis. Crit Rev. Oncol. Hematol.* **26**, 163-173 (1997).
2. Aubele,M. et al. *Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. Cancer Genet. Cytogenet.* **110**, 94-102 (1999).
3. Bostick,P.J. et al. *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.* **16**, 2632-2640 (1998).
4. Braun,S., Auer,M. & Rosenberg,R. [*Importance of occult metastatic cells in the treatment of patients with breast and gastrointestinal cancers*]. *Acta Med. Austriaca Suppl* **59**, 18-26 (2002).
5. Burchill,S.A. et al. *Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Br. J. Cancer* **71**, 278-281 (1995).
6. Bustin,S.A. & Dorudi,S. *Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays. Mol. Med. Today* **4**, 389-396 (1998).
7. Bustin,S.A., Gyselman,V.G., Siddiqi,S. & Dorudi,S. *Cytokeratin 20 is not a tissue-specific marker for the detection of malignant epithelial cells in the blood of colorectal cancer patients. Int. J. Surg. Investig.* **2**, 49-57 (2000).
8. Bustin,S.A., Gyselman,V.G., Williams,N.S. & Dorudi,S. *Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. Br. J. Cancer* **79**, 1813-1820 (1999).
9. Castells,A., Boix,L., Bessa,X., Gargallo,L. & Pique,J.M. *Detection of colonic cells in peripheral blood of colorectal cancer patients by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. Br. J. Cancer* **78**, 1368-1372 (1998).

Literaturverzeichnis

10. Chambers,A.F. et al. *Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **10**, 243-55, vii (2001).
11. Chomczynski,P. & Sacchi,N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
12. Conzelmann,M., Linnemann,U. & Berger,M.R. *Molecular detection of clinical colorectal cancer metastasis: how should multiple markers be put to use? Int. J. Colorectal Dis.* **20**, 137-146 (2005).
13. Deans,G.T., Parks,T.G., Rowlands,B.J. & Spence,R.A. *Prognostic factors in colorectal cancer. Br. J. Surg.* **79**, 608-613 (1992).
14. Dimmler,A. et al. *Transcription of cytokeratins 8, 18, and 19 in bone marrow and limited expression of cytokeratins 7 and 20 by carcinoma cells: inherent limitations for RT-PCR in the detection of isolated tumor cells. Lab Invest* **81**, 1351-1361 (2001).
15. Engel,J., Hölzel,D. & Kalies,H. *Manual Gastrointestinale Tumoren., pp. 3-6 M (2001).*
16. Funaki,N.O. et al. *Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. Br. J. Cancer* **77**, 1327-1332 (1998).
17. Ghossein,R.A. & Bhattacharya,S. *Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. Eur. J. Cancer* **36**, 1681-1694 (2000).
18. Giesing,M. et al. *Independent prognostication and therapy monitoring of breast cancer patients by DNA/RNA typing of minimal residual cancer cells. Int. J. Biol. Markers* **15**, 94-99 (2000).
19. Guadagni,F. et al. *Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers. Cancer Res.* **61**, 2523-2532 (2001).

Literaturverzeichnis

20. Guller,U. et al. *Disseminated single tumor cells as detected by real-time quantitative polymerase chain reaction represent a prognostic factor in patients undergoing surgery for colorectal cancer. Ann. Surg.* **236**, 768-775 (2002).
21. Gunn,J., McCall,J.L., Yun,K. & Wright,P.A. *Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse-transcription polymerase chain reaction. Lab Invest* **75**, 611-616 (1996).
22. Hardingham,J.E. et al. *Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. Int. J. Cancer* **89**, 8-13 (2000).
23. Heiss,M.M. et al. *Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. Nat. Med.* **1**, 1035-1039 (1995).
24. Hermanek,P. *Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. Anticancer Res.* **19**, 2771-2774 (1999).
25. Hirsch,F.R., Franklin,W.A., Gazdar,A.F. & Bunn,P.A., Jr. *Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology. Clin. Cancer Res.* **7**, 5-22 (2001).
26. Huang,P., Wang,J., Guo,Y. & Xie,W. *Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood in patients with gastrointestinal cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **129**, 192-198 (2003).
27. Illert,B. et al. *Disseminated tumor cells in the blood of patients with gastric cancer are an independent predictive marker of poor prognosis. Scand. J. Gastroenterol.* **40**, 843-849 (2005).
28. Janni,W. et al. *The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. Cancer* **103**, 884-891 (2005).
29. Jauch,K.W. et al. *Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. J. Clin. Oncol.* **14**, 1810-1817 (1996).

Literaturverzeichnis

30. Jonas,S., Windeatt,S., Boateng,A., Fordy,C. & Allen-Mersh,T.G. Identification of carcinoembryonic antigen-producing cells circulating in the blood of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Gut* **39**, 717-721 (1996).
31. Jung,R. et al. Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *Br. J. Cancer* **81**, 870-873 (1999).
32. Kalthoff,H. & Henne-Bruns,D. [Synopsis of modern tumor therapy with molecular biology methods]. *Langenbecks Arch. Chir Suppl Kongressbd.* **115**, 79-85 (1998).
33. Kruger,W. et al. Sensitivity of assays designed for the detection of disseminated epithelial tumor cells is influenced by cell separation methods. *Clin. Chem.* **46**, 435-436 (2000).
34. Kufer,P. et al. 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.* **62**, 251-261 (2002).
35. Kuukasjarvi,T. et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res.* **57**, 1597-1604 (1997).
36. Ladanyi,A., Soong,R., Tabiti,K., Molnar,B. & Tulassay,Z. Quantitative reverse transcription-PCR comparison of tumor cell enrichment methods. *Clin. Chem.* **47**, 1860-1863 (2001).
37. Leinung,S., Wurl,P., Weiss,C.L., Roder,I. & Schonfelder,M. Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma. *Langenbecks Arch. Surg.* **385**, 337-343 (2000).
38. Lindemann,F., Schlimok,G., Dirschedl,P., Witte,J. & Riethmuller,G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* **340**, 685-689 (1992).
39. Liotta,L.A., Saidel,M.G. & Kleinerman,J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res.* **36**, 889-894 (1976).

Literaturverzeichnis

40. Luzzi,K.J. et al. *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. Am. J. Pathol.* **153**, 865-873 (1998).
41. Millon,R. et al. *Detection of prostate-specific antigen- or prostate-specific membrane antigen-positive circulating cells in prostatic cancer patients: clinical implications. Eur. Urol.* **36**, 278-285 (1999).
42. Pantel,K. & Brakenhoff,R.H. *Dissecting the metastatic cascade. Nat. Rev. Cancer* **4**, 448-456 (2004).
43. Pantel,K., Cote,R.J. & Fodstad,O. *Detection and clinical importance of micrometastatic disease. J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 1113-1124 (1999).
44. Pantel,K. et al. *Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. J. Hematother.* **3**, 165-173 (1994).
45. Pantel,K. et al. *Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 1419-1424 (1993).
46. Pantel,K., von Knebel,D.M., Izbicki,J.R. & Riethmuller,G. *[Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies]. Chirurg* **68**, 1241-1250 (1997).
47. Park,S. et al. *Immunobead RT-PCR versus regular RT-PCR amplification of CEA mRNA in peripheral blood. J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**, 489-494 (2001).
48. Parkin,D.M., Pisani,P. & Ferlay,J. *Global cancer statistics. CA Cancer J. Clin.* **49**, 33-64, 1 (1999).
49. Ragnhammar,P. et al. *Effect of monoclonal antibody 17-1A and GM-CSF in patients with advanced colorectal carcinoma--long-lasting, complete remissions can be induced. Int. J. Cancer* **53**, 751-758 (1993).
50. Raj,G.V., Moreno,J.G. & Gomella,L.G. *Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. Cancer* **82**, 1419-1442 (1998).

Literaturverzeichnis

51. Robert-Koch-Institut & www.rki.de. Dachdokumentation Krebs. 2003.
52. Robinson,P.J. Imaging liver metastases: current limitations and future prospects. *Br. J. Radiol.* **73**, 234-241 (2000).
53. Rosenberg,R., Nekarda,H., Thorban,S. & Siewert,J.R. [Minimal residual disease in gastrointestinal tumors: tumor detection in bone marrow, blood and lymph nodes]. *Acta Med. Austriaca Suppl* **59**, 42-53 (2002).
54. Schott,A. et al. Isolated tumor cells are frequently detectable in the peritoneal cavity of gastric and colorectal cancer patients and serve as a new prognostic marker. *Ann. Surg.* **227**, 372-379 (1998).
55. Schuster,R. et al. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int. J. Cancer* **108**, 219-227 (2004).
56. Sobin,L.H. & Fleming,I.D. *TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition* (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* **80**, 1803-1804 (1997).
57. Soeth,E. et al. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res.* **57**, 3106-3110 (1997).
58. Soong,R. et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detection of cytokeratin 20 in noncolorectal lymph nodes. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3423-3429 (2001).
59. Staritz,P. et al. Detection of disseminated tumour cells as a potential surrogate-marker for monitoring palliative chemotherapy in colorectal cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **23**, 633-639 (2004).
60. van Eekelen,J.A., Shammas,F.V., Wee,L., Heikkila,R. & Osland,A. Quantitative analysis of cytokeratin 20 gene expression using RT-PCR and capillary electrophoresis with fluorescent DNA detection. *Clin. Biochem.* **33**, 457-464 (2000).

Literaturverzeichnis

61. *Vlems,F. et al. Effect of blood sample handling and reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay sensitivity on detection of CK20 expression in healthy donor blood. Diagn. Mol. Pathol. 11, 90-97 (2002).*
62. *von Knebel,D.M. & Lacroix,J. Nucleic acid based techniques for the detection of rare cancer cells in clinical samples. Cancer Metastasis Rev. 18, 43-64 (1999).*
63. *Weiss,L. Metastatic inefficiency. Adv. Cancer Res. 54, 159-211 (1990).*
64. *Weitz,J. & Herfarth,C. Surgical strategies and minimal residual disease detection. Semin. Surg. Oncol. 20, 329-333 (2001).*
65. *Weitz,J. et al. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. Clin. Cancer Res. 4, 343-348 (1998).*
66. *Weitz,J. et al. Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. Clin. Cancer Res. 5, 1830-1836 (1999).*
67. *Wharton,R.Q. et al. Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. Clin. Cancer Res. 5, 4158-4163 (1999).*
68. *Wyld,D.K. et al. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. Int. J. Cancer 79, 288-293 (1998).*
69. *Zhang,X.W., Fan,P., Yang,H.Y., Yang,L. & Chen,G.Y. [Significance of detecting disseminated tumor cells in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients]. Zhonghua Zhong. Liu Za Zhi. 25, 66-69 (2003).*

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Klaus Hallfeldt für die Betreuung dieser Arbeit danken.

Ebenso dankbar bin ich meinem Betreuer PD. Dr. med. Stefan Schmidbauer für die vielen wertvollen Hinweise sowie seine hilfreiche persönliche Förderung.

Meinem Mitbetreuer Herrn Dr. med. Wulf Siemel danke ich für die gute Anleitung im Labor, die vielen wertvollen Anregungen, mit denen er das Entstehen dieser Arbeit begleitete und seinen persönlichen Einsatz, durch den diese Arbeit erst möglich wurde.

Herrn Dr. Neth, Leiter des Chirurgischen Forschungslabors Innenstadt, möchte ich für die Einarbeitung in molekularbiologische Techniken sowie zahlreiche sachliche Hinweise danken.

Besonders möchte ich den Medizinisch-Technischen Assistentinnen aus dem Chirurgischen Forschungslabor Innenstadt für ihre Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft danken.

Weiterer Dank gilt meiner gesamten Familie, die mich in vielerlei Hinsicht stets unterstützte.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Kratschmar
Vorname Andrea
Geburtsdatum 18.04.1979 in München

Schulbildung

1985-1989 Grundschule an der Gilmstraße; München
1989-1998 Pestalozzi-Gymnasium; München
1998 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,5)

Studium

1998-2005 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2000 Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)
2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)
2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

Praktisches Jahr

2004-2005 Innere Medizin: McGill University Hospital, Montreal und KH München Schwabing
Chirurgie: Chir. Klinik und Poliklinik Innenstadt, Klinikum der Universität München
Gynäkologie und Geburtshilfe: Klinikum Starnberg

Promotionsarbeit

2002-2006 Promotion im Chirurg. Forschungslabor, Chirurgische Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der Universität München;
Betreuer: PD. Dr. Schmidbauer
Thema: „Nachweis disseminierter Tumorzellen in zentral-venösem Blut bei Patienten mit operablen gastro-intestinalen Karzinomen mittels Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion von Cytokeratin 20 Transkripten

Klinische Tätigkeit

seit 2005 Assistenzärztin im Klinikum Passau, Frauenklinik