

**Charite - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin**

Aus der Medizinischen Klinik III  
Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin  
Direktor Prof. Dr. E. Thiel

**Minimale Resterkrankung beim kolorektalen  
Karzinom. Nachweis disseminierter Tumorzellen  
in peripheren Blutproben und Knochen-  
markaspiraten mittels quantitativer RT-PCR**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an der Charité - Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von: **Dr. rer. nat. Ronny Schuster**  
aus: **Dresden**

Referent: Prof. Dr. Ulrich Keilholz

Korreferent: Prof. Dr. Horst Dürkop

Gedruckt mit Genehmigung der  
Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

promoviert am: 25. Februar 2005

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Konzept der minimalen Resterkrankung	1
1.2	Minimale Resterkrankung beim kolorektalen Karzinom	3
1.3	Adjuvante Therapie beim nichtmetastasierten kolorektalen Karzinom	4
1.4	Molekularbiologischer Nachweis einer minimalen Resterkrankung	5
1.5	Die Methode der RT-PCR zum Nachweis disseminierter Tumorzellen	7
1.6	Marker beim kolorektalen Karzinom	9
1.7	Zielsetzung	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Materialien	13
2.2	Probengewinnung und Probenkonservierung	16
2.2.1	Blutproben	16
2.2.2	Knochenmark	17
2.2.3	Gewebe	17
2.2.4	Zelllinien	17
2.2.5	Zellverdünnungsexperimente	18
2.3	Nachweis von RNA-Markern mittels Polymerasekettenreaktion	18
2.3.1	RNA-Isolierung	18
2.3.1.1	Blut und Knochenmark	19
2.3.1.2	Gewebe	20
2.3.1.3	Zelllinien	21
2.3.2	cDNA-Synthese	21
2.3.3	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)	22
2.3.4	Herstellung eines PCR-Standards	23
2.3.4.1	Konventionelle PCR	23
2.3.4.2	Reinigung des PCR-Produktes	23
2.3.4.3	Klonierung	23

2.3.5	Quantifizierung mittels Standards	24
2.3.6	Haushaltsgene	25
2.4	Nachweis epithelialer Zellen mittels Immunzytochemie	26
2.5	Statistik	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Methodische Ergebnisse	28
3.1.1	RNA Isolierung aus Vollblut	28
3.1.1.1	RNA-Ausbeute	28
3.1.1.2	DNA-Verunreinigung	30
3.1.2	cDNA-Synthese	31
3.1.2.1	RNA-Konzentration in der cDNA-Synthese	31
3.1.2.2	Oligo-dT- versus random-hexamer-Primer in der cDNA-Synthese	32
3.1.3	RT-PCR	33
3.1.3.1	Etablierung von PCR-Bedingungen	33
3.1.3.2	»Single-round« versus »nested« PCR	43
3.1.3.3	Quantitativer Bereich der PCR für ProtM, CEA, CK20 und WT1	44
3.1.5	Expression von Haushaltsgenen	46
3.2	Expression von ProtM, CEA, CK20 und WT1 in Zelllinien und Gewebe	48
3.3	Nachweis von Tumormarkern im Blut	49
3.3.1	Expression von ProtM, CEA, CK20 und WT1 in Blutproben von gesunden Spendern	49
3.3.2	Nachweis von Tumorzellen in manipulierten Blutproben	51
3.3.3	Expression von ProtM, CEA, CK20 und WT1 in Blutproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom	52
3.3.4	Vergleich prä- und postoperativ entnommener Blutproben	56
3.3.5	Vergleich der Sensitivität bei Entnahme von einer versus zwei Blutproben	56
3.3.6	Verteilung der PBGD-Expression in positiven Blutproben	57
3.4	Nachweis von Tumormarkern im Knochenmark	58
3.5	Nachweis von epithelialen Zellen in Knochenmarkausstrichen	59

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	Methodische Ergebnisse	62
4.1.1	RNA-Isolierung	62
4.1.2	cDNA-Synthese	63
4.1.3	qRT-PCR	64
4.2	Haushaltsgene	64
4.3	Nachweis von mRNA-Markern in Gewebeproben und Zelllinien	65
4.4	Hintergrundexpression in Blut und Knochenmark	66
4.5	Referenzbereich der Hintergrundexpression	67
4.6	Nachweis von mRNA-Markern im peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom	69
4.7	Nachweis von mRNA-Markern im Knochenmark von Patienten mit kolorektalem Karzinom	71
4.8	Einfluss der operativen Tumorentfernung auf den Nachweis von epithelialen Zellen in peripherem Blut	73
4.9	mRNA-Marker beim kolorektalen Karzinom	74
4.10	Ausblick	75
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Publikation der Ergebnisse</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>92</b>