

4 Diskussion

Das Ziel der Anwendung von RT-PCR-Ansätzen zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen ist die Definition einer Patientengruppe, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung hämatogener Metastasen aufweist. Darüber hinaus können mit dieser Methode die zirkulierende Tumorlast beobachtet, die Antigenexpression in zirkulierenden Tumorzellen untersucht und die Effektivität einer bewährten oder experimentellen Therapie abgeschätzt werden (Guadagni 2001). Zur Etablierung dieser Methode müssen folgende Teilaspekte untersucht und optimiert werden:

1. Die Spezifität der Methode: PCR-positive Ergebnisse repräsentieren mit ausreichender Wahrscheinlichkeit Tumorzellen.
2. Die Sensitivität der Methode: Mit der Entnahme von ein bis zwei Blut- oder Knochenmarksproben werden vorhandene Tumorzellen mit hoher Wahrscheinlichkeit erfaßt.
3. Der Zusammenhang zwischen dem Nachweis zirkulierender Tumorzellen und dem Potential zur Entwicklung von Fernmetastasen.
4. Geeignete adjuvante Therapiemöglichkeiten für Patienten mit einer minimalen Resterkrankung und die klinische Validierung im Rahmen von prospektiven Studien.

Das Ziel dieser Arbeit bezieht sich auf die ersten beiden Punkte und umfaßt die Evaluation dieser Methode unter Verwendung der quantitativen RT-PCR für das kolorektale Karzinom.

4.1 Methodische Ergebnisse

4.1.1 RNA-Isolierung

Der Weg von einer Blut-, Knochenmarks- oder Gewebsprobe zum Meßwert eines PCR-Laufs besteht aus vielen Teilschritten, die alle Einfluß auf das Ergebnis haben können. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die hier verwendete RNA-Isolierung aus Vollblut bzw. Knochenmark eine sehr robuste Methode darstellt. Das im Vorfeld eine Rolle spielende Zeitintervall zwischen Probenentnahme und –Stabilisierung wurde konsequent auf weniger als zwei Stunden beschränkt, so daß eine Beeinträchtigung der Probenqualität durch lange und/oder unsachgemäße Lagerungszeiten ausgeschlossen werden konnte. Für die Isopropanolausfällung wurden

verschiedene Zeiten und Temperaturen, die sich teils aus örtlichen Gegebenheiten, teils aus Versuchs-praktischen Erwägungen heraus ergaben, getestet. Dabei ergab sich, daß es für die RNA-Ausbeute und Probenqualität unerheblich war, ob die Isopropanolniederschlagung 2h oder 16-24h bei -20°C erfolgte. Auch die Ausfällungstemperatur war dabei nur von geringem Einfluß, solange -20°C nicht überschritten wurde und die Probe nicht gefroren war wie bei -80°C . Es konnte ebenso gezeigt werden, daß bei fast allen Proben die Verunreinigung durch genomische DNA nach erfolgter RNA-Isolierung zu vernachlässigen waren, solange die PCR-Primer so gewählt wurden, daß sie ein Intron von mehr als 1000bp einschlossen.

Die hier verwendete Methode beruht auf der Annahme, daß die isolierte und in cDNA umgeschriebene RNA ausschließlich zellulären Ursprungs ist, d.h. daß die entsprechenden Zellen bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme vital waren. Freie RNA wird bekanntlicherweise durch die ubiquitär vorhandenen RNasen sehr schnell abgebaut. Allerdings gibt es Hinweise darauf, daß RNA auch aus Blutplasma isoliert werden kann (Silva 2001). Die Erklärung dieses Phänomens bleibt unklar und würde den Vorteil des Nachweises von RNA-Sequenzen im Gegensatz zu DNA in Frage stellen.

4.1.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese, d.h. das Umschreiben der RNA in die wesentlich stabilere DNA, sollte unter Minimierung des Informationsverlustes erfolgen. Zum einen müssen die Konzentrationsverhältnisse von Primern, Enzymen, Bausteinen und RNA optimiert werden, was nach den Empfehlungen des Kit-Herstellers erfolgte, und zum anderen geeignete Primer gewählt werden. Die RNA-Konzentration der Ansätze sollte in einem bestimmte Bereich liegen, wobei die obere Grenze durch die Enzymkonzentration (DNA-Polymerase) festgelegt ist. Für den Nachweis von seltenen Transkripten kann es von Vorteil sein, die Probe so konzentriert wie möglich aufzuarbeiten. Deshalb wurde in einem Teil der Proben die standardisierte Aufarbeitung verlassen und die RNA- und parallel dazu die Enzymkonzentration erhöht. Es konnte gezeigt werden, das eine dreifache Konzentrierung problemlos möglich war, ohne die Probenqualität zu beeinflussen.

Prinzipiell lassen sich folgende Primer unterscheiden: ein Gemisch aus random-Hexameren, oligo-dT-Primer und Sequenz-spezifische Primer. Letztere zeigen die günstigste Ausbeute für die entsprechende Sequenz (Zippelius 2000b, Park 2001). Sequenz-spezifische Primer beschränken allerdings die Verwendbarkeit der entsprechenden Probe für den Nachweis von lediglich einem Marker, womit die Anwendung von Markerkombinationen und die parallele Amplifikation eines HKGs ausgeschlossen sind. Ein Vergleich der unspezifischen Primer fiel in dieser Arbeit im

Gegensatz zu anderen Studien (Zippelius 2000b) zugunsten der oligo-dT-Primer aus, obwohl die Nachweissequenzen nicht alle in der Nähe der Poly-A-Region lagen.

4.1.3 qRT-PCR

Einen beträchtlichen Anteil an der teilweise widersprüchlichen Vielfalt der veröffentlichten Studien mit RT-PCR wird der nicht ausreichenden Optimierung bzw. Standardisierung der PCR-Bedingungen zugesprochen (Zippelius 2000b). Noch unübersichtlicher ist die Situation bei der Auswahl geeigneter Primer, da die Primeretablierung noch einen großen empirischen Anteil enthält, dessen Auswirkung auf die Qualität des Endergebnisses schwer zu definieren ist. Die in dieser Arbeit verwendete quantitative PCR hat u.a. den Vorteil, daß die PCR-Reaktion direkt zeitgleich beobachtet werden kann. Daher kann die Optimierung der PCR-Bedingungen neben der Sensitivität die Kurvenform, die einen wesentlichen Einfluß auf die Quantifizierung der Probenkonzentration hat und damit auch die Qualität der PCR-Reaktion widerspiegelt, umfassen. Mit den PCR-Bedingungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ist eine Quantifizierung über einen breiten Konzentrationsbereich bis hin zu 10 Standardmolekülen und ein Nachweis von bis zu einem Molekül in der Glaskapillare möglich. Diese überzeugend hohe Sensitivität sowie die in dieser Arbeit durchgeführten Vergleichsuntersuchungen lassen das Konzept der Ineinanderschachtelung von PCR-Läufen, welches zeitaufwendig und mit einem hohen Kontaminationsrisiko verbunden ist, überflüssig werden. Entsprechende Ergebnisse wurden auch in anderen Arbeiten zur qRT-PCR (Bustin 1998, Soong 2001, Straub 2001) sowie zur konventionellen PCR (Zippelius 2000b) erhalten.

4.2 Haushaltsgene

Ein weiterer Vorteil der qRT-PCR ist die Möglichkeit, Variationen der RNA- und/oder cDNA-Qualität durch Quantifizierung von Haushaltsgenen und nachfolgender Normierung der Markerkonzentration auf die des HKGs zu berücksichtigen. In dieser Arbeit wurde PBGD verwendet, welches die dazu nötigen Eigenschaften der konstitutiven Expression sowie des Fehlens von Pseudogenen aufweist. Die Homogenität der PBGD-Expression in dieser Arbeit ist mit einem Verhältnis der 90%- zur 10%-Percentile von 4,8 sehr überzeugend, was sowohl PBGD als geeignetes HKG sowie die gute Qualität der Probenverarbeitung bestätigt. Bezüglich des zweiten untersuchten HKGs, G6PD, ist die Situation komplexer. G6PD variiert über einen wesentlich größeren Konzentrationsbereich, so daß das Verhältnis der 90%- zur 10%-Percentile 12 und der Gesamtumfang mehrere Größenordnungen umfaßt. Damit können unter der Annahme, daß

die G6PD-Konzentration eine wesentlich höhere Variabilität aufweist, falsch positive Marker/HKG-Werte entstehen, da einige der Proben eine sehr geringe G6PD-Konzentration aufwiesen. Dieses Phänomen könnte zum Teil auf G6PD-Varianten zurückgeführt werden, die allerdings in unseren Breiten eher selten sind (Miwa 1996). Desweiteren konnte keine Korrelation zwischen PBGD- und G6PD-Werten einer Probe gefunden werden, so daß man davon ausgehen muß, daß G6PD als HKG ungeeignet ist. Andere verwendete HKG sind z.B. GAPDH, β -Aktin, β 2-Mikroglobulin, Cyclophilin und β -Aktin (Medhurst 2000, Bustin 2002, Lupberger 2002). Da wahrscheinlich keines der bisher untersuchten HKG als das ideale anzusehen ist, wäre es für weitere Arbeiten empfehlenswert, zwei geeignete HKG zu benutzen, um Kandidaten, die aufgrund von biologischen Schwankungen der HKG-Expression falsch positiv bzw. falsch negativ sind, zu ermitteln.

Falsch negative Ergebnisse können auch aufgrund einer schlechten Aufarbeitungsqualität entstehen, da seltene Transkripte unterhalb einer bestimmten Menge nicht mehr nachweisbar sind. Bei der Betrachtung des Nachweises von CEA, CK20, ProtM und WT1 in allen untersuchten Blutproben ergab sich, daß lediglich neun Blutproben negativ für alle Marker waren. Die HKG-Expression dieser Proben war gleichmäßig über den gesamten PBGD-Bereich verteilt und nicht, wie man es im Falle einer schlechten cDNA-Qualität annehmen müßte, auf den unteren Bereich beschränkt.

Bei der Untersuchung von Knochenmark sollte die Verwendung von PBGD mit größerer Vorsicht erfolgen, da während der Hämatopoese ein Isoenzym von PBGD, welches durch alternatives Splicing entsteht (Chretien 1988), aktiv ist. In dieser Arbeit war zwar der Umfang der PBGD-Expression im Knochenmark, obwohl eine Größenordnung über der des Blutes gelegen, überraschend begrenzt, aber dafür die Gruppengröße mit 10 Patienten und 20 Referenzproben noch nicht ausreichend groß, um eine generelle Aussage zu erzielen. Das Problem ließe sich mit anderen Primern aus der 5'-nahen-Region, die nur die Sequenz eines Isoenzym charakterisieren, umgehen.

4.3 Nachweis von mRNA-Markern in Gewebeproben und Zelllinien

Zum Zeitpunkt der klinischen Diagnose enthalten solide Tumoren ein breites Spektrum genetisch und epigenetisch heterogener Zellen. Dies resultiert in einer Vielzahl funktioneller Abnormalitäten, die die Zellstruktur und -funktion beeinflusst und die große Vielzahl von Phänotypen und Genotypen in diesen Tumoren erklärt (Bustin 1998). Trotz der hohen Expression von

CEA und CK20 in Gewebeproben und von ProM in Zelllinien schwanken die Expressionsniveaus zwischen zwei und fünf Größenordnungen. Der Umfang dieser Schwankungen hat einen offensichtlichen Einfluß auf die diagnostische Sensitivität im Blut. Am Beispiel der manipulierten, mit COLO205-Zellen-versetzten Blutproben wird klar, daß die Sensitivität der Methode grundsätzlich von der Markerexpression in zirkulierenden Zellen sowie von der entsprechenden Hintergrundexpression im Blut oder Knochenmark abhängig ist. Grob orientierend läßt sich aus dem Sensitivitätsexperiment ableiten, daß für den Nachweis von weniger als 100 Zellen in 10ml Blut mindestens eine Markerkopie (in NSM) pro Zelle nach Abrechnung des Aufarbeitungsverlustes vorhanden sein muß.

Neben den verschiedenen Expressionsprofilen im Ursprungsgewebe, können auch zirkulierende Tumorzellen ein verändertes Expressionsmuster aufweisen (Liefers 1998, Ghossein 2000). Daher ist es nicht verwunderlich, daß unter Verwendung mehrerer Marker, auch Multimarker-Ansatz genannt, die Sensitivität erheblich steigt (Bustin 1999, Wharton 1999, Ghossein 2000, Guadagni 2001, Kufer 2002). Allerdings läßt sich auch damit aufgrund der Tumorzellheterogenität keinerlei quantitative Korrelation zwischen Markerkonzentration und Tumorzelllast im Blut herstellen.

4.4 Hintergrundexpression in Blut und Knochenmark

Ein großes Problem der gegenwärtigen Methode ist die Hintergrundexpression aller bisher verwendeten Marker im Blut und Knochenmark, deren Ursache noch nicht vollständig geklärt ist (Hampton 2002). Es ist zudem bekannt, daß diese Expression durch Zytokine beeinflusst wird (Jung 1998, Goeminne 1999), so daß z.B. entzündliche Erkrankungen oder eine Vorbehandlung des Patienten mit z.B. G-CSF einen Einfluß auf die Meßwerte haben können. In dieser Arbeit wurde für alle Marker eine Hintergrundexpression in Blut und Knochenmark nachgewiesen. Für RegIV und A33 war die Hintergrundexpression in einem Konzentrationsbereich, der den Nachweis seltener Transkripte unmöglich machen würde. Die Expression von CEA und CK20 mRNA im Blut lag etwa eine Größenordnung über der von WT1 und ProtM. Auch die Anzahl der Referenzblutproben, in denen die erstgenannten nachgewiesen werden konnten, war wesentlich höher. Bis auf WT1, welches im Knochenmark eine größere Hintergrundexpression als im Blut aufweist, waren die Verhältnisse im Knochenmark vergleichbar. Die in der Literatur kontrovers angegebenen Hintergrundexpressionen im Blut für CEA und CK20 rangieren von 0% (Weitz 1998) bis 100% (Van Eekelen 2000). Ursächlich dafür ist zum einen die unterschiedliche Sensitivität der angewandten Methoden sowie verschiedene Arten der Probenaufar-

beitung vor RNA-Isolierung: Nutzung von Vollblut, Isolierung von weißen Blutzellen nach Lyse der Erythrozyten oder Isolierung von mononuklearen Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation (Vlems 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen haben versucht, CK20 separat in Zellunterpopulationen des Vollblutes nachzuweisen, um die Aufarbeitung zu optimieren. Allerdings waren die Ergebnisse bezüglich der CK20-Expression in Granulozyten und mononuklearen Zellen widersprüchlich (Champelovier 1999, Van Eekelen 2000, Vlems 2002), so daß die optimale Aufarbeitungsmethode noch aussteht. Zum anderen können bei Aufarbeitungsmethoden, wo die Zellen vor RNA-Isolierung separiert oder Erythrozyten lysiert werden, Tumorzellen verloren gehen (Keilholz 1998, Krüger 2000, Zippelius 2000b), so daß in dieser Arbeit die Isolierung aus Vollblut präferiert wurde. Ein weiterer Vorteil für die RNA-Isolierung aus Vollblut ist, daß eine mögliche aufarbeitungsbedingte Stimulierung von Leukozyten vermieden wird (Kruse 1997).

Kürzlich wurde eine Splice-Variante von CEA in weißen Blutzellen nachgewiesen, die unter Verwendung der Primer von Gerhardt (1994) ebenfalls amplifiziert wird und die zumindest einen Teil der Hintergrundexpression von CEA klären könnte (Hampton 2002). Da in unserer Arbeit sequenzspezifische Sonden verwendet wurden, wurde diese CEA-Variante mit unserem Ansatz nicht nachgewiesen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Splice-Variante ohne Sondenbindung vervielfältigt wurde und somit mit der eigentlichen CEA-Sequenz konkurrierte. Eine entsprechende Bande auf dem Gel konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Die kürzlich entwickelte Methode der Tumorzellanreicherung mittels immunomagnetischer Technik könnte einen Fortschritt für die Minimierung der Hintergrundexpression darstellen (Denis 1997, Ghossein 2000, Hardingham 2000, Zhong 2000, Park 2001). Inwieweit die dabei gewonnene absolute Anzahl von Transkripten aus einer Blutprobe ausreicht, um bessere quantitative Ergebnisse zu erzielen, bleibt abzuwarten. Für die immunzytologische Untersuchung von Knochenmarksaspiraten hat sich mit dieser Methode kein Vorteil ergeben (Kasimir-Bauer 2002).

4.5 Referenzbereich der Hintergrundexpression

Die Hintergrundexpression erforderte die Einführung von Grenzwerten. Für die Methode der konventionellen PCR wurde dies indirekt über die Reduktion der Anzahl der PCR-Zyklen oder des Probenvolumens realisiert (Park 2001). Für die quantitative PCR, wo HKG quantifiziert werden können, wird der Grenzwert auf das Verhältnis der Marker/HKG-Konzentrationen bezogen. Beide Methoden können unterschiedliche Ergebnisse liefern, besonders für den Fall einer schlechten cDNA-Qualität.

Die Festlegung des Referenzbereiches der Hintergrundexpression erfordert die Kenntnis der Verteilung der Hintergrundexpression in einer Referenzpopulation. Der Begriff Normalbereich wird in der Medizin nicht verwendet, da der Begriff „normal“ nicht genau definiert werden kann. Eine Referenzpopulation sollte ein Kollektiv mit einem besonders gutem Gesundheitszustand darstellen, bei dem die fragliche Krankheit sehr unwahrscheinlich ist. Damit wird die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Befunde minimiert. Andererseits sollte die Zusammensetzung der Referenzstichprobe dem Kollektiv der Kranken so ähnlich wie möglich sein, um falsch positive Befunde zu vermeiden. Desweiteren sollte die Referenzstichprobe groß genug sein, damit der berechnete Referenzbereich dem der Referenzpopulation in etwa entspricht (Diagnostik im Gespräch 3/2000, www.vdgh.de). Als Referenzbereich, dessen Größe von den festgelegten Fehlerwahrscheinlichkeiten für den Fehler erster und zweiter Art abhängig ist, wird üblicherweise der Anteil der Verteilung festgelegt, in dem 95% der Werte liegen. Je nach der Natur des Meßwertes ergeben sich ein- oder zweiseitige Grenzen.

Das in dieser Arbeit untersuchte Referenzkollektiv erfüllt zwar nur teilweise die genannten Anforderungen, ist aber für die Überprüfung der prinzipiellen Anwendbarkeit der Methode ausreichend. In anderen Arbeiten zur qRT-PCR wurde als obere Grenze des Referenzbereiches das Maximum der gefundenen Hintergrundexpression in Referenzproben verwendet (Dimmler 2001, Ito 2002). Für ProtM und WT1 war es aufgrund des seltenen Nachweises in Gesundheitsproben nicht sinnvoll, die Daten einer Verteilung zuzuordnen. Da die Hintergrundexpression für beide Marker im Blut gering war, wurde das Maximum bzw. der doppelte Wert als Grenzwert verwendet. Für CEA und CK20 im peripheren Blut konnten empirische Verteilungen ermittelt werden und über die Berechnung der Perzentilen ein Referenzbereich festgelegt werden.

Die Festlegung des Grenzwertes bzw. des Referenzbereiches entspricht einer simultanen Optimierung der beiden Variablen Sensitivität und Spezifität. Zur Vermeidung falsch positiver Werte d.h. ein positiver Markernachweis im Referenzkollektiv, erwies sich für CEA und CK20 die 99%-Perzentile als optimal. Die gegenüber der Grenzwertstrategie II erhöhte Spezifität war allerdings mit einem Sensitivitätsverlust verbunden.

Für die Ermittlung eines Referenzbereiches für Knochenmarksproben bestand die Schwierigkeit, daß ein Teil der Referenzknochenmarksproben von Patienten mit vorwiegend hämatologischen Krankheiten gewonnen wurden, die eine veränderte Knochenmarksmorphologie aufwiesen. Die aufwendige Berechnung von Referenzbereichen auf dieser Basis ist demnach fraglich. Da auch nur eine kleine Anzahl von Patientenknochenmarksproben erhalten werden kann-

ten, sollte der Vergleich zwischen Patienten- und Referenzknochenmark lediglich der Aufdeckung eines Trends dienen. Für Knochenmark wurde deshalb der Maximalwert des Marker/HKG-Verhältnisses im gesamten und im eingeschränkten (ohne morphologische Veränderungen) Referenzkollektiv als Grenzwert betrachtet.

4.6 Nachweis von mRNA-Markern im peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom

Unter Verwendung der erarbeiteten Referenzintervalle wurden 13% der hier untersuchten Patienten (17 von 129; (ProtM: 1, CEA: 11, CK20: 5)) als positiv für „Tumorzellen im peripheren Blut“ ermittelt. Bei Einschränkung des Referenzbereichs (Strategie II) wurde die Spezifität der Methode deutlich geringer. Bemerkenswert war, daß nur ein geringer Anteil der Patienten im Stadium IV, d.h. mit Fernmetastasen, positive Marker/HKG-Verhältnisse aufwies. Dieser Umstand war auch unabhängig von der Tatsache, ob die Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Therapie erhielten oder nicht.

Um noch einmal die Bedeutung der Normierung der Markerkonzentration auf die des HKGs zu untersuchen, wurden für die absoluten Markerkonzentrationen ebenfalls Grenzwerte eingeführt, die auf der Verteilung im Gesundblut beruhen. Dabei ergaben sich für 25 Patienten erhöhte Markerwerte im Blut, wobei die o.g. 17 Patienten in dieser Gruppe enthalten waren. Unter der Annahme, daß unser HKG tatsächlich die Aufarbeitungsqualität widerspiegelt, würde diese Methode acht falsch positive Ergebnisse produzieren.

In Anbetracht des Ergebnisses stellt sich die Frage, ob Meßwerte, die den Grenzwert überschreiten, auch wirklich ein Korrelat in Form von Tumorzellen im peripheren Blut besitzen oder lediglich falsch positive Meßwerte sind. Betrachtet man als erstes getrennt für jeden Marker den Anteil der Probanden/Patienten, bei denen der Marker im peripheren Blut nachgewiesen werden konnte, so war dieser fast identisch. Damit wurden die untersuchten Marker nicht häufiger bei Patienten nachgewiesen als bei Gesunden. Betrachtet man als nächstes die Marker/HKG-Werte, die außerhalb des Referenzbereiches lagen, so liegen diese Werte in 72% der Fälle in der Nähe der Grenzwerte. Dies galt für alle CK20-Werte und für einige der CEA-Werte. Ausnahmen waren fünf CEA-Werte und der eine grenzüberschreitende ProtM-Wert, die die Obergrenze um mehr als das Vierfache überschritten. Damit ist das Studienergebnis sehr empfindlich gegenüber der Festlegung des Referenzbereiches und nicht sonderlich robust. Als dritten Punkt interessiert die Frage, ob eine Korrelation zwischen dem Krankheitsstadium und der Häufigkeit positiver Markerwerte relativ zum Grenzwert besteht. Wir fanden sowohl beim Kolon- als auch

Rektumkarzinom kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Stadien. Diese Fakten unterstreichen, daß positive Marker/HKG-Verhältnisse sowohl eine Hintergrundexpression als auch Tumorzellen im Blut widerspiegeln können. Einen Beweis für das eine oder andere kann nur unter Zuhilfenahme weiterer Methoden, wie z.B. der Flußzytometrie (Racila 1998), geführt werden.

In ähnlicher Weise unklare Ergebnisse wurde bei der zytologischen Untersuchung CEA-PCR-positiver Mesenterialblutproben (Koch 2001), morphologischen und Immunfluoreszenz-Untersuchung von CK20-PCR-positiven Zellen des Knochenmark (Litle 1997) sowie beim Nachweis von CK20-mRNA mittels qPCR im peripheren Blut (Bustin 1999) erhalten. Bezüglich der Nachweisraten von verschiedenen mRNA-Markern wurden sehr verschiedene Ergebnisse in anderen Gruppen (Tab. 4.1) erzielt. Einige Autoren fanden ähnlich niedrige Nachweisraten wie in dieser Arbeit (Weitz 1999, Hardingham 2000, Koch 2001, Ito 2002). Hohe Werte waren teilweise mit einer geringen Spezifität korreliert, indem z.B. 55% der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Castells 1998) oder 23% der Referenzblutproben (Jonas 1996) positiv für CEA-mRNA waren. Eine Hypothese für die niedrigen Detektionsraten ist,

Tab. 4.1 Literaturdaten zum Nachweis von Tumorzellen im peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom

Autor	Patienten mit positiver Blutprobe (%)	UICC Stadium	Marker
Jonas 1996	84	IV	CEA
Mori 1996	35 (50)	I-IV (IV)	CEA
Guadagni 2001	69 (76)	I-IV (IV)	CEA
Castells 1998	41 (60)	I-IV (IV)	CEA
Ito 2002	4 präop., 26 postop.	0-III	CEA
Patel 2002	69	I-IV	CEA, CK20
Weitz 1998	41	I-III	CK20
Wharton 1999	74	I-IV	CEA, CK20
Wylid 1998	48	IV	CK20
Soeth 1997	17	I-IV	CK20
Koch 2001	11	I-IV	CK20
Chausovsky 1999	63	IV	CK20
Weitz 1999	12.5	I-II	CK20
Hardingham 2000	20	I-III	CK20, CK19, MUCI,II

daß Tumorzellen diskontinuierlich und in Zellhaufen ausgeschwemmt werden (Jonas 1996, Castells 1998). Betrachtet man das relativ große Patientenkollektiv, daß in dieser Arbeit untersucht wurde, sowie die Tatsache, daß selbst bei der Entnahme von mehreren Blutproben zu einem bzw. mehreren Zeitpunkten, die Nachweisraten eher spärlich waren, so muß die Steuerung von Tumorzellen ein seltenes oder diskontinuierliches Ereignis sein. Insbesondere entsteht daraus die Frage, ob das periphere Blut für das kolorektale Karzinom ein geeignetes Kompartiment für den Nachweis von Tumorzellen ist. Eine andere Erklärung wäre auch die Kaskadentheorie der Tumorzellstreuung beim kolorektalen Karzinom. Hierbei wird angenommen, daß die Tumorzellen, mit Ausnahme der Tumoren, die nicht im Einflußbereich der Pfordader stehen, über Mesenterialvenen und Pfordader in die Leber gelangen, die eine Filterfunktion ausübt (Koch 2001). Das würde auch erklären, daß hämatogene Metastasen vorwiegend in der Leber entstehen und daß andere Lokalisationen eher selten und wenn, dann zeitlich nach der Leber betroffen sind. Argumente zugunsten dieser Hypothese wurden auch mit simultanen Untersuchungen von Mesenterialvenen-, Zentralvenen- und peripherem Blut gesammelt (Ueda 1998, Koch 2001). Dabei war die Anzahl der Tumorzellen, die allerdings indirekt über eine CK20-RT-PCR bestimmt wurden, im Mesenterialvenenblut signifikant über der der anderen beiden Kompartimente gelegen. Damit wäre das periphere Blut zur Erfassung der Tumorzellstreuung in frühen Krankheitsphasen völlig ungeeignet. Mesenterialvenenblut, was nach dieser Theorie das Kompartiment der Wahl wäre, ist lediglich im Rahmen des operativen Eingriffes zugänglich, was dessen Verfügbarkeit drastisch einschränkt. Mehrfachuntersuchungen wären nicht möglich. Desweiteren kann der Zeitpunkt der Operation auch ungünstig für ein objektives Bild der Tumorzellstreuung sein, da eventuell vermehrt Zytokine ausgeschüttet werden oder aber andere epitheliale Zellen in die Zirkulation gelangen.

4.7 Nachweis von mRNA-Markern im Knochenmark von Patienten mit kolorektalem Karzinom

Die ursprünglichen Arbeiten über den Nachweis einer minimalen Resterkrankung beziehen sich auf Untersuchungen von Knochenmarkaspiraten (Lindemann 1992, Müller 2000, Jauch 1995). Es wird angenommen, daß auch bei Tumoren, die nicht in erster Linie Knochenmetastasen bilden, Tumorzellen vermehrt im Knochenmark verweilen (Lindemann 1992, Ueda 1998, Weitz 1999, Koch 2001). Diese Vorstellung unterstützend, wurden in manchen Arbeiten höhere Nachweisraten okkulten Tumorzellen im Knochenmark vergleichend mit peripherem Blut erhalten (Soeth 1997).

In dieser Arbeit konnten lediglich zehn Knochenmarkproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom gewonnen werden. Keine der Patientenknochenmarkproben zeigte erhöhte Markerkonzentrationen. Dies war in Übereinstimmung mit den entsprechenden Blutproben, die auch alle negativ bezüglich der Referenzintervalle waren. Die immunzytologischen Untersuchungen der entsprechenden Knochenmarkausstriche konnten auch keinen definitiven Tumorzellnachweis erbringen. Zellen, deren Zytoplasma nach Anwendung des Nexell-Kits gefärbt waren, was lediglich bei zwei Patienten auftrat, konnten aufgrund der Morphologie oder des Färbeverhaltens nicht eindeutig Tumorzellen zugeordnet werden. Die immunzytologischen Untersuchungen sind allerdings aufgrund der hier verwendeten Ausführung kritisch zu beurteilen. Gewöhnlicherweise werden aus Knochenmarkaspiraten Zytospins hergestellt, wobei ein Großteil der Verunreinigungen durch Erythrozyten und diverse Plasmabestandteile vorher entfernt werden. Damit werden unspezifische Reaktionen im Verlauf der Färbeprozedur vermindert, ein optimaler Erhalt der Morphologie erzielt und die Quantifizierung erleichtert. Zum anderen gilt auch für Knochenmarkuntersuchungen, daß bei jedem zusätzlichen Aufarbeitungsschritt Tumorzellen verloren gehen können. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß der für Zytospins ausgelegte Nexell-Kit prinzipiell auch für Knochenmarkausstriche angewendet werden kann. Die Qualität des Endergebnisses ist dabei allerdings sehr stark von der Qualität der Knochenmarksentnahme abhängig. Eine hohe Anzahl knochenmarkansässiger Zellen mit nur einer geringen Beimischung von Blut gestattet auch hier ein qualitativ gutes Ergebnis.

Aufgrund der nur kleinen Vergleichsgruppe kann keine Aussage über einen möglichen Vorteil des Kompartiments Knochenmark über den des peripheren Blutes gemacht werden. Ein Nachteil ist die aufwendigere Zugänglichkeit sowie die größeren Risiken für den Patienten.

Trotz der langjährigen Erfahrungen, die für den Nachweis von Tumorzellen solider Tumoren in Knochenmarkausstrichen mittels Immunzytochemie existieren, sind auch hier unter Zuhilfenahme zusätzlicher Methoden Zweifel an der Herkunft der Zellen aufgetaucht. Es wurden z.B. keine chromosomalen Veränderungen in CK20-positiven Knochenmarkzellen gefunden, obwohl 40-60% der Zellen von Tumorgewebe und Metastasen entsprechende Veränderungen aufweisen (Litle 1997). Ebenso problematisch war die Zuordnung der CK20-positiven Zellen zu epithelialen oder hämatopoetischen Zellen (Gerhard 1994). Beim Nachweis von epithelialen Zellen mittels Antikörpern gegen CK18 waren bis zu 30% der gefärbten Zellen falsch positiv (Litle 1996). Die Ergebnisse von RT-PCR und Immunzytochemie können voneinander abweichen, da mittels Immunzytochemie das fertige Protein und durch RT-PCR dessen Vorstufe nachgewiesen wird. Paradoxerweise war in einer Arbeit die Anzahl der Marker-Positiven für die

Immunzytochemie größer als für die RT-PCR, was mit Änderungen auf dem posttranslationalen Niveau erklärt wurde (Dimmler 2001).

Ein neuer Ansatz betrifft die Untersuchung des proliferativen Potentials von epithelialen Zellen in Knochenmarksaspiraten (Solakoglu 2002). Es konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der Zytokeratin-positiven Zellen nach Wachstum in Zellkultur wesentlich besser mit der Krankheitsprognose korrelierte als der Nachweis im Ausgangsmaterial. Allerdings wurden diese Ergebnisse nur für eine Gesamtheit von verschiedenen epithelialen Tumoren erzielt, und die Relevanz dieses Ergebnisses für das kolorektale Karzinom bleibt noch zu zeigen. Insgesamt scheint dieser Ansatz attraktiv zu sein, da neben dem reinen Nachweis von epithelialen Zellen auch dessen proliferatives Potential als mögliche Voraussetzung für eine Metastasierung mit einbezogen wird. Neben dem immunzytologischen Nachweis in der Zellkultur, wäre hier ein Versuch angebracht, diese Zellen mit qRT-PCR nachzuweisen, da durch die Vermehrung der Tumorzellen die Hintergrundexpression von Markern in noch vorhandenen hämatologischen Zellen von geringerer Bedeutung wäre.

4.8 Einfluss der operativen Tumorentfernung auf den Nachweis von epithelialen Zellen in peripherem Blut

Hämatogene Metastasen entstehen durch Invasion von Tumorzellen in das Gefäßsystem. Voraussetzungen dafür können aufgrund des lokalen Tumorwachstums oder auch während der Operation des Primärtumors in Abhängigkeit von der Operationstechnik geschaffen werden. Die Ergebnisse über die Prognoserelevanz der Operationstechnik sind allerdings kontrovers (Weitz 2001). Standardtherapie ist die sogenannte no-touch-Technik, wobei der Tumor mit dem zugehörigen Lymphabflußwegen im Block entnommen wird. Die Fähigkeiten des Operateurs sind dabei von nicht geringer Bedeutung (Herfarth 2001). Andere Faktoren, die das Schicksal von zurückgelassenen oder freigesetzten Tumorzellen ganz wesentlich beeinflussen können, sind die Gewebsverletzung, die in Abhängigkeit von ihrem Ausmaß die Freisetzung lokal oder systemisch wirksamer Faktoren bedingen. Von besonderer Bedeutung für die Kontrolle freigesetzter Tumorzellen könnte die Suppression der zellulären Immunität durch das operative Trauma, damit verbundener Blutverlust, Bluttransfusionen, Hypothermie, Anästhesie und Schmerzen sein (Shakhar 2003). In mehreren Arbeiten gibt es Hinweise dafür, daß Tumorzellen während der Operation des Primärtumors in die Zirkulation gelangen (Weitz 1998, Ito 2002). In unserem Fall hatten zwei der Patienten im postoperativen Blut erhöhte Markerwerte. Das könnte Aus-

druck der obengenannte These sein. Andererseits wäre auch eine diskontinuierliche Tumorzellstreuung unabhängig von der Operation oder aber falsch positive Meßwerte denkbar. An dieser Stelle ergibt sich die Frage, falls der Nachweis tatsächlich Tumorzellen entspräche, wie das Potential dieser Zellen, Fernmetastasen zu bilden, einzuschätzen wäre. Zellen in einem Primärtumor durchlaufen verschiedene Entwicklungsstadien, wobei anfangs ihre Immunogenität eher gering ist und erst ab einer bestimmten Tumorgroße Gefahrensignale wie endzündungsfördernde Zytokine, Hitzeschockproteine u.a. nach außen gelangen und das Immunsystem in Alarmbereitschaft setzen. Andererseits entwickeln Tumorzellen unter Selektionsdruck Escapemechanismen, um den Zellen des Immunsystems zu entkommen. Es ist demnach nicht unbedeutend, zu welchem Zeitpunkt der Tumorentwicklung maligne Zellen die Blutbahn erreichen. Ein früher Operationszeitpunkt hat mehrere Vorteile: die freigesetzten Zellen sind noch ungeübt in der Auseinandersetzung und die systemische Immunsuppression ist geringer aufgrund eines geringeren Traumas (Shakhar 2003).

4.9 mRNA-Marker beim kolorektalen Karzinom

Ein wesentlicher Punkt betrifft die Eignung der hier verwendeten mRNA-Marker zum Nachweis von Tumorzellen im peripheren Blut. Die beiden schon vielfach verwendeten Marker CK20 und CEA werden in den meisten Tumorzellen ausreichend hoch exprimiert, aber in ihrer Eignung durch die relativ hohe Hintergrundexpression in Blut und Knochenmark entwertet. Außerdem kann angenommen werden, daß auch normale Mukosazellen im Rahmen entzündlicher Prozesse in den Blutkreislauf eingeschwemmt werden, was natürlich auch bei einem gleichzeitig vorhandenem kolorektalen Karzinom der Fall sein kann. Demnach sind solche Marker wie CEA oder CK20, deren Expression in normaler Mukosa ebenso hoch wie im Tumorgewebe ist, die also eher gewebs- als tumorspezifisch sind, problematisch aufgrund der Gefahr von falsch positiven Resultaten (Hardingham 2000). Der erstmals verwendete Marker ProtM zeigt mit einer geringen Hintergrundexpression in peripherem Blut sowie geringer Expression in normaler Mukosa ein günstiges Profil. Trotz dieser hoffnungsvollen Parameter scheint die Expression in Tumorzellgewebe nicht ausreichend zu sein. Dieser Fakt unterstreicht noch einmal, daß das Expressionsprofil von Tumorzelllinien nicht unbedingt repräsentativ für zirkulierende Tumorzellen ist. Ähnlich gestaltet sich die Problematik bei WT1, dessen Expression im Tumorgewebe ebenfalls nicht ausreichend ist. Es bleibt damit die Aufgabe, weiterhin nach geeigneten Zielgenen zu suchen. Hoffnungsvolle Ergebnisse wurden mit CK19 erzielt (Denis 1997), wobei Immunobeads verwendet wurden, d.h. ein zusätzlicher Aufarbeitungsschritt. Bei normaler Aufar-

beitung war CK19 ebenso im Gesundblut nachweisbar. Neuere Arbeiten beschäftigen sich u.a. mit Mitgliedern der MAGE-Familie, die für eine Reihe tumorspezifischer Antigene kodieren (Boon 1996) und die trotz Aufarbeitung von Vollblut in diesen Arbeiten nicht im Referenzblut und –Knochenmark nachweisbar waren (Kufer 2002). Allerdings wurde in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe für MAGE 3 und 6 eine erhebliche Hintergrundexpression nachgewiesen.

4.10 Ausblick

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit den Ergebnissen dieser Arbeit die Eignung des Kompartments „peripheres Blut“ zum Nachweis von Tumorzellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom hinterfragt wird. Es wurden überzeugende Argumente für die Annahme, daß die Problematik des Nachweises von disseminierten Tumorzellen vorwiegend ein System-immanentes Problem ist, zusammengetragen. Dennoch kann für zukünftige Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Situation durch Entwicklung neuer Markergene und durch die Verfeinerung der Aufarbeitungstechniken und gezielten Isolierung von epithelialen Zellen im Vorfeld der qRT-PCR, die die Spezifität der Methode bei gleichbleibender Sensitivität möglicherweise erhöhen können, ändert. Ein anderer Ansatz, der die molekularbiologische Untersuchung von Primärtumoren betrifft, die beim kolorektalem Karzinom zum Zeitpunkt der Operation des Primärtumors problemlos möglich wäre, gewinnt durch die Microarray-Technik zunehmend an Bedeutung. Durch das sogenannte „Profiling mit Microarrays“, wo keine Einzelmarker mehr, sondern Genexpressionsmuster dargestellt und verglichen werden, kann ein Genexpressionsmuster-Vergleich von Primärtumoren und Metastasen durchgeführt werden und typische Eigenschaften von metastasierungsfreudigen Tumoren herausgearbeitet werden. Letztlich kann die Aussagekraft all dieser Nachweismethoden nur durch prospektive klinische Studien, deren Erfolg auch von den vorhandenen Therapiemöglichkeiten abhängt, getestet werden.