

Aus der Medizinischen Klinik III (Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin)  
des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin  
Direktor: Prof. Dr. med. E. Thiel

**Nachweis und Quantifizierung von  
kolorektalen Tumorzellen in peripherem Blut  
mittels Real-time PCR**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: Florian Nikolaus Thilo  
aus : Berlin

Referent: Prof. Dr. med. U. Keilholz  
Koreferent: Prof. Dr. med. Dr. h.c. L.C. Tung

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der  
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 7. September 2001

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Das kolorektale Karzinom	7
1.1.1 Adjuvante Therapie des kolorektalen Karzinoms	7
1.2 Tumormarker	8
1.2.1 RNA-Tumormarker	9
1.3 Problemstellung	10
<b>2. Untersuchungsgut und Methodik</b>	<b>13</b>
2.1 Verwendetes Untersuchungsgut	13
2.1.1 Blut	13
2.1.2 Gewebe	14
2.1.3 Zelllinien	15
2.2 Verwendete Methoden	15
2.2.1 Isolierung von RNA	15
2.2.2 RNA-Gelelektrophorese	17
2.2.3 Quantifizierung der RNA	17
2.2.4 cDNA-Synthese	18
2.2.5 Real time on-line PCR	20
2.2.6 Analyse der Schmelzkurve	28
2.2.7 Standards	29
2.2.8 DNA-Gelelektrophorese	29
2.2.9 Qualitätskontrolle	30
2.2.10 Titrationsexperimente	33
2.3 Statistische Methoden	35
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1 Ergebnisse der Etablierungsphase	35
3.1.1 Isolierung von RNA	35
3.1.2 cDNA-Synthese	38
3.1.3 Titrationsexperimente	40
3.1.4 Real time on-line PCR	45

3.2 Ergebnisse an Patientenproben	48
3.2.1 Kolongewebe	48
3.2.2 Gesundblut	50
3.2.3 Patientenblut	50
3.3 Analyse der Schmelzkurve	60
3.4 Standardkurven	60
<b>4. Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1 Durchgeführte Experimente	63
4.2 Methodenkritik	63
4.2.1 Angewendete PCR-Methode	63
4.2.2 Sensitivität, $\beta$ 2m, PBG-D	64
4.2.3 Spezifität	66
4.2.4 Quantifizierung der RT-PCR-Amplifikate	68
4.2.5 Standardisierung der Methode	69
4.2.6 Untersuchungsgut	69
4.3 Methodische Verbesserungsvorschläge	70
4.4 mRNA-Tumormarker für den Nachweis von kolorektalen Tumorzellen	70
4.4.1 CEA	70
4.4.2 Ccsg 1	71
4.4.3 Protease M	71
4.4.4 Andere Tumormarker	73
4.5 Prognostische Signifikanz der zirkulierenden Tumorzellen	73
4.6 Schlußfolgerung	74
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
5.1 Hintergrund	75
5.2 Ziele	75
5.3 Untersuchungsgut und Methodik	75
5.4 Ergebnisse	75
5.5 Auswertung	76
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>Danksagung</b>	<b>90</b>



## **5. Zusammenfassung**

### **5.1 Hintergrund**

Der quantitative Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen durch die RT-PCR ist immer noch mühselig, und die meisten Marker, die als Objekte der RT-PCR benutzt werden, sind entweder nicht tumorspezifisch oder nicht sensitiv genug oder beides. Wir untersuchten anhand eines Real-time RT-PCR Ansatzes zwei neue Marker und CEA.

### **5.2 Ziele**

Wir wollten einen quantifizierbaren Real-time Reversen Transkriptions (RT) Polymerasekettenreaktions (PCR) Ansatz zum Nachweis zirkulierender kolorektaler Tumorzellen etablieren und herausfinden, ob Protease M oder Colon carcinoma specific gene 1 (Ccsg1) dem Carcinoembryonalen Antigen (CEA) hierbei als Tumormarker überlegen sind.

### **5.3 Untersuchungsgut und Methodik**

Wir haben einen für Protease M und CEA spezifischen Real-time RT-PCR Ansatz entwickelt und diesen durch die in Titrationsexperimenten mit Protease M und CEA positiven Zellen in Gesundblut gewonnenen Ergebnisse verbessert. Mithilfe des gewonnenen Protokolls untersuchten wir Blut (n=24) und Tumorgewebe (n=9) von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Die Spezifität wurde anhand der Untersuchung von gesundem Blut (n=7) und gesundem Kolongewebe (n=6) bestimmt.

### **5.4 Ergebnisse**

In unseren Titrationsexperimenten konnten wir Protease M im Vergleich zu CEA drei Zehnerpotenzen an Tumorzellen früher detektieren. Von den sieben Gesundblutproben war eine (14%) CEA mRNA-positiv und keine Protease M (0%) oder Ccsg1 (0%) positiv. Die Expression von Protease M und CEA variierte in gesundem - und neoplastischem Gewebe stark. Protease M wurde im Gegensatz zu CEA in Tumorgewebe höher exprimiert als in gesundem Gewebe. In

Patientenblutproben korrelierte die Expression von Protease M-mRNA nicht mit der von CEA-mRNA ( $p=0,88$ ). Unser interner Standard war dem Vergleich mit PBG-D nicht überlegen.

## **5.5 Auswertung**

Mit Protease M-mRNA lassen sich zirkulierende kolorektale Tumorzellen in einem Real-time RT-PCR Ansatz nachweisen und quantifizieren. Ob Protease M hierbei sensitiver oder spezifischer als CEA ist, müssen nachfolgende Arbeiten untersuchen.