

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Im Jahr 1995 starben in Deutschland 30561 Menschen an kolorektalen Karzinomen. Mit 14,4% sind sie die zweithäufigste Todesursache unter malignen Tumoren. 55000 Menschen erkranken durchschnittlich jedes Jahr neu an kolorektalen Karzinomen in der Bundesrepublik Deutschland (Schalhorn et Jauch 2000). Es ist eine Systemerkrankung (Mori et al. 1996). Obwohl ca. 80% der Betroffenen zum Zeitpunkt der Vorstellung potentiell chirurgisch heilbar sind, versterben letztendlich die Hälfte an dieser Krankheit. Den Krankheitsrückfall nach einer potentiell kurativen Resektion schreibt man einer minimalen Resterkrankung und vom Primärtumor entfernt liegenden Mikrometastasen zum Zeitpunkt der Resektion zu (Sinicrope et al. 1995). Bei dieser Krankheit werden wahrscheinlich schon sehr früh im Krankheitsverlauf Tumorzellen in den Kreislauf ausgestreut, die mit traditionellen Methoden wie z.B. histologischen Untersuchungen, nur selten nachzuweisen sind. (Zytologie siehe Goldblatt et Nadel 1965; Immunzytochemie siehe Lindemann et al. 1992, Leather et al. 1993, Kvalheim 1998; Molekularer Nachweis siehe Raj et al. 1998, Pantel et al. 1999, Ko et al. 1998.) Oft wachsen einige wenige (0.01%) (Glaves et al. 1988) dieser Zellen zu Metastasen heran, die meist nicht mehr geheilt werden können. Gelänge es, diese Zellen nicht nur nachzuweisen, sondern auch zu quantifizieren, dann könnte geprüft werden, ob eine größere Menge an zirkulierenden Tumorzellen mit einem größeren Risiko des Krankheitsrückfalles einhergeht (Pelkey et al. 1996).

1.1.1 Adjuvante Therapie des kolorektalen Karzinoms

Hochrisikopatienten mit minimaler Resterkrankung könnten gezielt einer adjuvanten Behandlung zugeführt werden. Das Ziel jeglicher adjuvanten Therapie ist es, lebensfähige Tumorzellen zu eradizieren, um so die Wahrscheinlichkeit eines Rückfalls zu vermindern und die Lebenserwartung des Patienten zu verbessern (Gastrointestinal Tumor Study Group 1984; NIH consensus conference 1990). Die bisherige Stadieneinteilung (Astler et Coller 1953, Rubio et al. 1977) leidet an einer beträchtlichen prognostischen Heterogenität innerhalb einzelner Stadien. Im Stadium II ($T_3/T_4N_0M_0$ =Dukes B) werden die meisten Patienten geheilt, 20-30% aber

nicht. Im Stadium III (T_xN_1/N_2M_0 =Dukes C) werden dagegen ca. 30% geheilt, 70% aber werden ihrer Krankheit erliegen (Bustin et al. 1998). Insbesondere Patienten dieser Stadien können von einer adjuvanten Therapie profitieren (Sinicrope et al. 1995, Moertel et al. 1990; O'Connell et al. 1994). Zwar wird die Prognose des Patienten bis heute vor allem am Ausmaß des Primärtumors, seiner Differenzierung und der Präsenz von regionären Lymphknotenmetastasen gemessen (Lindemann et al. 1992). Aber im Zuge der Entwicklung anderer und besserer Protokolle zur adjuvanten Therapie wächst ebenso der Bedarf an zusätzlichen und besseren Prognosefaktoren, um die Möglichkeiten dieser Form der Therapie ganz ausschöpfen zu können (Hornsby-lewis et Herbsman 1993). Insbesondere molekulare Methoden der Diagnostik erscheinen hierbei vielversprechend (Guan et Van Dam 1999). Attraktiv ist Blut als Untersuchungsmedium weil es so leicht zu gewinnen ist.

1.2 Tumormarker

Traditionelle Marker zur Tumordiagnostik sind große Moleküle, meist Glykoproteine, die bei malignen Erkrankungen im neoplastischen Gewebe überexprimiert und vom Tumor in den Kreislauf ausgeschüttet werden. Geringe Mengen dieser Proteine werden normalerweise in dem gesunden Gewebe exprimiert, aus dem sich die maligne Zelle entwickelt hat. Bei bestimmten Tumoren lassen erhöhte Serumspiegel Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf zu, doch begrenzen falsch-positive Ergebnisse ihren Wert zur Früherkennung von malignen Tumoren bei symptomfreien Patienten (Wagner 1995, Keilholz 1998). Ein solches Screening ist allenfalls bei Risikogruppen angebracht. Tumormarker werden außer zur Tumordiagnostik in Verbindung mit anderen Verfahren vor allem zur Stadieneinteilung, zur Kontrolle des Therapieerfolgs und zur Erkennung einer Progredienz eingesetzt. Hinweise auf den Therapieerfolg lassen sich dabei allerdings nur gewinnen, wenn der präoperative Wert erhöht war. Ein typischer Tumormarker bei dem kolorektalen Karzinom ist das Carcinoembryonale Antigen (CEA). Es wurde von Gold et al. 1965 zum ersten Mal beschrieben. 1969 beschrieben Thomson et al. einen Radioimmunoassay für zirkulierendes CEA. 1974 zeigte eine erste große Studie den Wert dieser Untersuchung (Hansen et al. 1974). Bei 80% der Patienten mit fortgeschrittenem

kolorektalen Karzinom werden erhöhte Mengen am Glykoprotein CEA in den Kreislauf ausgeschüttet (Allen-Mersh 1984). Es wird angenommen, daß CEA nicht von Zellen produziert wird, die sich normalerweise im Blut befinden (Jonas et al. 1996). Es ist nicht tumorspezifisch und wurde in Gesundblut nachgewiesen. Lange Zeit bot der Serumspiegel des CEA den frühesten Anhalt eines Rezidivs (Kelly et al. 1992). Tumormarker wurden aber auch mit anderen Methoden als dem Radioimmunoassay untersucht, und insbesondere der Ansatz mittels PCR erscheint vielversprechend (Sidransky 1995).

1.2.1 RNA-Tumormarker

Da mRNA nur in lebensfähigen Zellen transkribiert wird, und extrazelluläre RNA schnell degradiert, deutet der Nachweis von gewebsspezifischer mRNA in peripherem Blut auf die Präsenz zirkulierender Tumorzellen hin (Keilholz 1997, Jonas et al. 1996). Smith et al. publizierte 1991 zum ersten Mal eine Arbeit, in der die Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) benutzt wurde, um bei Patienten mit malignem Melanom durch die Vervielfältigung von gewebsspezifischen Genen versteckte Tumorzellen nachzuweisen. Nach kompletter Resektion eines kolorektalen Primärtumors oder seiner regionären Metastasen könnten RT-PCR Ansätze zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen nützlich sein, daß Risiko einer systemischen Streuung zu beurteilen. Eine derartige Stadieneinteilung nach molekularen Gesichtspunkten („molecular staging“: Caldas 1997, 1998) könnte Licht in den Prozeß der Metastasierung bringen und letztendlich eine Entscheidungsgrundlage für die adjuvante Therapie bilden. Außerdem könnte die Verlaufsbeobachtung gewebsspezifischer Gene Antigen-negative Tumorvarianten erkennen lassen, die sich im Verlauf der Krankheit entwickeln bzw. die durch Immuntherapie induziert werden (Keilholz 1998). In diversen Studien verschiedener Arbeitsgruppen sind Patienten mit kolorektalem Karzinom unterschiedlicher Stadien auf die Präsenz von zirkulierenden Tumorzellen untersucht worden. Inzwischen haben viele Autoren gezeigt, daß die PCR, was den Nachweis von malignen Zellen im peripheren Blut angeht, anderen Methoden, wie z.B. der Immunzytochemie in Bezug auf die Sensitivität überlegen ist. (Übersichten finden sich bei: Johnson et al. 1995, Jäger et al. 1996, Raj et al. 1998, Keilholz et al. 1998, Bustin et al. 1998, Ko et

al. 1998, Liefers et al. 1999.) Mittels RT-PCR konnte eine maligne Zelle in 10^7 gesunden Zellen nachgewiesen werden (Johnson et al. 1995). Die hohe Sensitivität und Spezifität der Methode haben eine ganze Reihe von schlagkräftigen Ansätzen ins Leben gerufen, um die systemische Streuung und minimale Resterkrankung von malignen Prozessen zu überwachen. Dabei lassen sich zwei Arten von Genen unterscheiden: gewebsspezifische Gene, die nur auf der Ebene der mRNA untersucht werden können (z.B. Tyrosinase für das maligne Melanom) und anormale Genprodukte, wie mutierte oder fusionierte Gene, die zusätzlich auf der Ebene der DNA angegangen werden können (z.B. mutiertes K-ras für Pankreas- und kolorektales Karzinom). Untersuchungen an mRNA weisen im Gegensatz zu denen an DNA wichtige Eigenheiten auf: RNA zerfällt leicht und kann durch die fast ubiquitären RNAsen, die z.B. in Erythrozyten in großen Mengen auftreten, schnell degradiert werden. Die Expression der mRNA variiert sowohl zwischen einzelnen Tumorzellen, als auch innerhalb einer Tumorzelle zu verschiedenen Zeiten als Folge der chaotischen Transkriptionsaktivität in entarteten Zellen (Nicolson 1991, Cox et al. 1997, von Knebel Doeberitz et Lacroix 1999). Idealerweise wäre das Genprodukt tumorspezifisch, z.B. ein chimärisches Fusionsprodukt wie mutiertes K-ras. Doch so etwas gibt es nur für wenige Tumoren. Ist das Gen auch nicht tumorspezifisch, so sollte es wenigstens nicht in Gesundblut vorkommen, um nicht zu falsch-positiven Ergebnissen zu führen. Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität der PCR könnten mRNA-Marker den traditionellen Markern trotz der erwähnten Einschränkungen ebenbürtig, wenn nicht überlegen sein (Keilholz et al. 1997).

1.3 Problemstellung

Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen mit Hilfe der RT-PCR war Gegenstand einer stetig wachsenden Zahl von Veröffentlichungen in den letzten Jahren. Bei diesen Arbeiten möchten wir zwei Aspekte ins Auge fassen: 1. Die meisten untersuchten Tumormarker stellten sich als entweder nicht tumorspezifisch, nicht besonders sensitiv oder beides heraus. 2. Die beschriebenen Methoden der quantitativen RT-PCR sind meist zeit- und arbeitsaufwendig.

Ad 1. : Insbesondere CEA-mRNA wurde häufig als Marker zum Nachweis zirkulierender kolorektaler Tumorzellen gewählt: Gerhard et al. 1994, Mori et al.

1996, Jonas et al. 1996, Castells et al. 1998, Ko et al. 1998. CEA-mRNA bietet als Marker zum Nachweis kolorektaler Tumorzellen Vor- und Nachteile. Die CEA-Expression wird z.B. in dem ganz überwiegenden Teil aller kolorektalen Tumoren aufrechterhalten (Shively et al. 1985). Außerdem stellte sich heraus, daß die Nested PCR CEA-exprimierende Tumorzellen mit einer Sensitivität von einer in 10^5 bis zu einer in 10^7 mononukleären Zellen, abhängig von der Zelllinie und dem Experimentierprotokoll, detektieren kann. Im Vergleich zur Immunzytologie stellte sich die PCR auf CEA-mRNA damit als gleich sensitiv heraus. Doch wird die Nested RT-PCR zusätzlich durch eine hohe Quote falsch-positiver Resultate eingeschränkt (Ko et al. 1998).

Ad 2. : Alle oben erwähnten Autoren quantifizierten anhand des Endpunktes der PCR, wobei die für eine Quantifizierung notwendigen Informationen verlorengehen. Ansätze, die Serienverdünnungen oder kompetitive PCR beinhalten, sind zu aufwendig, um für die Routine in Frage zu kommen. Erst die Entwicklung der Real-time PCR Technik schuf eine einfache Methode, um zuverlässig zu quantifizieren (Oldach 1999, Freeman et al. 1999). Diese Methode wurde von Nakanishi et al. 1999 genutzt, um Tumorzellen in der Peritonealflüssigkeit zu detektieren.

Wir bedienten uns der LightCycler Technologie (Wittwer et al. 1997), die einen schnellen Thermocycler mit dem Real time on-line Nachweis des Prozesses der Amplifizierung verbindet, um zirkulierende kolorektale Tumorzellen nachzuweisen und zu quantifizieren. Auf der Suche nach besseren Markern prüften wir Protease M-mRNA, von der gezeigt wurde, daß sie einer Gewebszuteilung in kolorektalem Karzinom unterliegt. Sie wurde als Tumormarker für Brust-, Ovar- und andere Karzinome vorgeschlagen (Anisowicz et al. 1996, Diamandis et al. 2000). Außerdem testeten wir Colon carcinoma specific gene 1-mRNA (Ccsg 1), das einer Sequenzpooldatei entstammt. Zum Vergleich untersuchten wir CEA-mRNA. In Titrationsexperimenten untersuchten wir die Quantifizierbarkeit und Sensitivität unseres Ansatzes. In vitro Transkripte von Protease M und CEA, sowie ihrer jeweiligen internen Standardkontrollen lieferten Standardkurven, die eine absolute Quantifizierung der mRNA Kopien ermöglichen. Nach unserer Kenntnis wurde die

Detektion zirkulierender kolorektaler Tumorzellen mit der LightCycler Technologie anhand von Protease M-mRNA noch nicht beschrieben.