

1 Einleitung

1.1 Das Konzept der minimalen Resterkrankung

Für eine Großzahl von malignen Tumoren gibt es heutzutage sehr effektive Therapiekonzepte. Durch operative Tumorentfernung und/oder Chemotherapie lassen sich in vielen Fällen komplette klinische Remissionen erzielen. Krankheitsrezidive nach erfolgreicher Primärbehandlung sind jedoch nicht selten, da häufig Tumorzellen im Körper verbleiben bzw. nach autologer Stammzelltransplantation in den Körper zurück gelangen (Kostler 2000). Die mit konventionellen Methoden, z.B. histologischer Aufarbeitung der Ränder des Operationsresektats und entnommener Lymphknoten oder Untersuchung von Knochenmarkausstrichen, nicht nachweisbaren Tumorzellen werden als minimale Resterkrankung (minimal residual disease = MRD) bezeichnet. Inwieweit eine komplette Remission einer Heilung entspricht, hängt einerseits von der Quantität und Qualität der verbliebenen Tumorzellen und andererseits möglicherweise von der Immunabwehr des Patienten ab. Es ist generell bekannt, daß der Nachweis von disseminierten Tumorzellen nicht notwendigerweise mit der Bildung von Fernmetastasen einhergeht, da die Implantation von solchen Zellen ein höchst ineffektiver Prozeß zu sein scheint. Andererseits kann auch ein ineffektiver Prozeß bei ausreichend langer Dauer irgendwann zum „Erfolg“ führen (Weitz 2001).

Die Vorstellung, daß einzelne disseminierte Tumorzellen die Ursache für den letztlichen Mißerfolg einer Behandlung sind, regte eine Vielzahl von Studien an, genau diese Zellen nachzuweisen und durch gezielte Therapie zu vernichten. Durch den Einsatz höchst empfindlicher Nachweismethoden wie der Immunzytochemie, Immunhistochemie, Polymerasekettenreaktion (PCR), Durchflußzytometrie oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung lassen sich einzelne Tumorzellen heute unter 10^4 bis 10^7 Hintergrundzellen nachweisen. Als mögliche Untersuchungsmedien für disseminierte Tumorzellen stehen z.B. peripheres Blut, Zentralvenenblut, Mesenterialvenenblut, Knochenmark, Lymphknoten, Peritonealflüssigkeit, Stuhl oder Urin zur Verfügung, wobei insbesondere leicht und wiederholbar zugängliche Körperflüssigkeiten für eine Langzeitüberwachung des Krankheitsgeschehens von Interesse sind (Bockmann 2001). Das Ziel

dieses Konzeptes ist, mit den heute zur Verfügung stehenden sehr sensitiven Methoden eine minimale Resterkrankung zu erfassen, die Therapie individuell anzupassen und somit die individuelle Krankheitsprognose zu verbessern.

Für einige Leukämien und Lymphomerkrankungen ist der Nachweis der MRD bereits ein fester Bestandteil der Therapie, um deren Effektivität zu überwachen und das Rezidivrisiko abzuschätzen (Vidriales 2003, Voena 2003). Beispiele dafür sind akute lymphatische und myeloische Leukämien des Kindesalters (z.B. AML2002-Protokoll), die akute Promyelozytenleukämie während und nach Chemotherapie, die chronische myeloische Leukämie während der Behandlung mit α -Interferon und nach allogener Knochenmarkstransplantation (Dolken 2001, Campana 2003, Eckert 2003). Der Nachweis einer MRD erfolgt hier mittels PCR oder Durchflußzytometrie (Campana 2003).

Dieses Konzept ist jedoch noch nicht für alle Krankheitsentitäten etabliert. Zum einen ist es insbesondere für solide Tumoren unklar, wie und wo disseminierte Tumorzellen nachzuweisen sind und welche dieser Zellen das Potential besitzen, Fernmetastasen zu bilden. Zum anderen fehlt es teilweise an effektiven therapeutischen Substanzen, die gezielt disseminierte Tumorzellen angreifen. Mit dem Monitoring von gestreuten Tumorzellen und der Möglichkeit, die Eigenschaften dieser Zellen, z.B. Oberflächenantigene, zu untersuchen, werden allerdings auch neue Optionen für die Entwicklung von Pharmaka geschaffen, z.B. in Form von spezifisch wirkenden Antikörpern wie Her2, Ep-CAM(17-1A) und CD20 oder durch Vaccinierungsstrategien, die darauf abzielen, das eigene Immunsystem auf bestimmte tumorspezifische Antigene zu sensibilisieren (Funaro 2000, Kostler 2000, Bocchia 2001, Roovers 2001, Berinstein 2003, Roggel 2003).

Für die Gruppe der soliden Tumoren gibt es eine Vielzahl von Arbeiten über den Nachweis disseminierter Tumorzellen. Im Mittelpunkt stand dabei die Untersuchung von Blut- und Knochenmarkproben von Patienten mit Mammakarzinom, gynäkologischen Tumoren, malignen Melanomen, Karzinomen des Gastrointestinaltraktes, der Lunge und der Prostata. Für einige Tumorentitäten wurden vielversprechende Ergebnisse erzielt. Für eine Gruppe von Patientinnen mit Mammakarzinom, deren Lymphknoten histologisch frei von Tumorzellen waren, waren in 35% der Fälle Tumorzellen in Knochenmarkausstrichen nachweisbar (Roggel 2003). Diese Patientengruppe hatte eine schlechtere Prognose als Patientinnen ohne Knochenmarkmikrometastasen (Hinterberger 2002). Der Nachweis von Tumorzellen in Knochenmarkausstrichen und peripheren Blutproben war ebenfalls von prognostischer Bedeutung für Patientinnen mit Ovarialkarzinom (Engel 1999, Roggel 2003). Der positive Nachweis von Tumorzellen in der Perito-

neallavage oder im Knochenmark mittels eines Antikörpers gegen Zytokeratin-18 bei Bestehen eines Magenkarzinoms korrelierte mit der Prognose in frühen Tumorstadien nach Tumorresektion in kurativer Absicht (Seeliger 2003). Kürzlich wurde der Nachweis von Tumorzellen in verschiedenen Körperflüssigkeiten mittels des mRNA-Markers Tyrosinhydroxylase für das Neuroblastom etabliert (Lambooy 2003). Auch hier zeichnet sich ab, daß der Tumorzellnachweis ein unabhängiger Prognosefaktor sein könnte (Tchirkov 2003). Insgesamt bleibt aber die Frage nach der Anwendbarkeit für die Gruppe der soliden Tumoren bis jetzt unbeantwortet (Pantel 2000).

1.2 Minimale Resterkrankung beim kolorektalen Karzinom

Das kolorektale Karzinom gehört zu einer Gruppe von soliden Tumoren, die relativ gut zu behandeln und oft zu heilen sind. Die chirurgische Tumorresektion ist die erste Behandlungsmodalität, wodurch etwa 40% der Patienten geheilt werden. Allerdings erleiden etwa 20-40% aller Patienten, die bei Erstdiagnose ein Stadium I oder II aufwiesen, trotz erfolgreicher R0-Resektion ein Krankheitsrezidiv (Jonas 1996, Castells 1998, Futamura 1998, Liefers 2002). In der Mehrzahl der Fälle (70-80%) treten Fernmetastasen (meist Lebermetastasen) auf, die immer noch die Hauptodesursache in dieser Patientengruppe ausmachen (Fidler 1994, Litle 1997). Fernmetastasen entstehen aus Tumorzellen, die sich aus dem Verband des Primärtumors gelöst, Anschluß an ein Blutgefäß gefunden und das Potential zur Ansiedelung in verschiedenen Geweben haben. Der Zeitpunkt der hämatogenen Streuung von Tumorzellen hängt von verschiedenen Faktoren wie der Tumorgröße, der Differenzierung und dem Wachstumsmuster ab und kann sowohl in frühen Stadien der Tumorerkrankung, d.h. auch im Stadium I oder II (Holash 1999), als auch während der operativen Entfernung des Primärtumors erfolgen (Mori 1996, Weitz 1998, Ito 2002). Neben der Möglichkeit der rein mechanischen Freisetzung von Tumorzellen werden im Zusammenhang mit operativen Eingriffen auch andere Mechanismen diskutiert, die einen fördernden Einfluß auf verbliebene Tumorzellen haben könnten: Anregung der Angiogenese, Freisetzung von Wachstumsfaktoren und postoperative Immunsuppression (Shakhar 2003). Durch diese Faktoren können möglicherweise Metastasen entstehen, die unter normalen Bedingungen vom Körper kontrolliert werden könnten.

1.3 Adjuvante Therapie beim nichtmetastasierten kolorektalen Karzinom

Das Ziel einer adjuvanten Therapie ist die Vernichtung disseminierter Tumorzellen nach vollständiger Resektion des makroskopisch nichtmetastasierten Primärtumors, um die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs zu verringern und die einer Heilung zu erhöhen. Die Basis des laufenden Therapiekonzeptes bilden Klassifikationen auf der Grundlage prognostischer Faktoren für die Rezidivwahrscheinlichkeit. Als statistisch gesicherte Prognosefaktoren gelten die Ausdehnung des Tumors in der Darmwand, der Lymphknotenbefall sowie eine vorhandene Fernmetastasierung. Diese Faktoren bilden die Grundlage der gebräuchlichen Staging-Systeme: in der klassischen Form die Einteilung nach Dukes oder die auf der TNM-Einteilung beruhende UICC-Klassifikation (Deans 1992, Bustin 1998). Die Indikation einer adjuvanten Chemotherapie beim nichtmetastasierten kolorektalen Karzinom im Anschluß an eine operative Tumorexstirpation wird nach wie vor am histologischen Lymphknotenpräparat entschieden, wobei ein Nachweis von Tumorzellen in entnommenen Lymphknoten, d.h. ein Tumorstadium UICC III bzw. Dukes C, die Therapieindikation impliziert (Liefers 2002). Diese Therapieempfehlung basiert auf mehreren Studien, in denen für ein Tumorstadium III mit adjuvanter Chemotherapie sowohl eine Verlängerung der rezidivfreien Zeit als auch des Gesamtüberlebens beobachtet wurde (NIH consensus conference 1990). Die Standardtherapie bilden 5FU/Folinsäure-enthaltende Schemata (z.B. Mayo Schema). In neueren Studien werden Substanzen wie Irinotecan oder Oxaliplatin eingesetzt, die sich bereits in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms bewährt haben. Weitere sich in der Testung befindende Therapieoptionen, die insbesondere bei der Behandlung einer MRD erfolgsversprechend sein könnten, sind biologischer Art. Dazu zählen der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, z.B. gegen VEGF oder EGFR (McCarthy 2003), eine unspezifische Immunstimulation und Vaccinierungsstrategien, für die bereits Phase-II und -III-Studien abgeschlossen sind (Mocellin 2002, Rivoltini 2003).

Trotz der ständigen Weiterentwicklung adjuvanter therapeutischer Möglichkeiten konnte bisher nicht überzeugend gezeigt werden, daß Patienten im Stadium UICC I oder II von einer solchen Therapie profitieren (IMPACT B2 1999, Zaniboni 1998). Eine routinemäßige postoperative Nachbehandlung wird deshalb für diese Patientengruppe weiterhin nicht empfohlen. Es ist allerdings bekannt, daß die Primärtumoren beim kolorektalen Karzinom sowohl auf genetischem als auch epigenetischem Niveau sehr heterogen sind. Demnach können Tumoren, die durch ähnliche histopathologischen Eigenschaften charakterisiert sind, mit ganz unterschiedlichen Prognosen und Ansprechraten für eine Therapie gekoppelt sein (Liefers 2002). Selbst wenn

es für die gesamte Gruppe von Patienten in den Stadien I oder II nicht von statistisch gesichertem Vorteil ist, sich einer adjuvanten Therapie mit den derzeit gängigen Medikamenten zu unterziehen, wird möglicherweise eine Untergruppe davon profitieren. Diese Untergruppen sind gegenwärtig noch nicht Bestandteil des Staging-Systems, da ihre Definition mangels statistisch gesicherter Prognosefaktoren noch unklar ist.

Zusammenfassend ergibt sich folglich, daß die Entscheidung für eine adjuvante Therapie bis zum heutigen Zeitpunkt auf der Grundlage einer statistischen Prognose in Form der UICC Stadieneinteilung und nicht entsprechend des persönlichen Risikoprofiles eines Patienten getroffen wird (Pantel 2000, Weitz 2001).

1.4 Molekularbiologischer Nachweis einer minimalen Resterkrankung

Die Untersuchung auf eine minimalen Resterkrankung beinhaltet den Nachweis einzelner Tumorzellen in geeigneten Kompartimenten. Ein bedeutender Fortschritt auf diesem Gebiet wurde mit der Weiterentwicklung immunzytologischer Techniken erreicht. Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Zytokeratin-18 konnte Lindemann (1992) Tumorzellen in Knochenmarkaspiraten von Patienten mit kolorektalem Karzinom nachweisen. Der positive Nachweis in 32% der Patienten war mit früheren Rezidiven sowie verkürzter Lebenszeit verbunden. Obwohl dem Knochen hinsichtlich der Lokalisation von Fernmetastasen beim kolorektalen Karzinom eine untergeordnete Bedeutung zukommt, lassen sich trotzdem bei dieser Erkrankung vermehrt Tumorzellen im Knochenmark nachweisen (Lindemann 1992, Ueda 1998, Weitz 1999, Koch 2001). Methodisch gesehen ist die mikroskopische Untersuchung von Knochenmarkausstrichen, die präferentiell doppel-blind ausgeführt werden sollte, jedoch aufwendig, untersucherabhängig, und sie erfordert geschultes Personal zur Unterscheidung von hämatopoetischen Vorläuferzellen und Tumorzellen (Pelkey 1996), was die routinemäßige Anwendung erschwert (Kufer 2002). Desweiteren können auch hämatopoetische Vorläuferzellen mit dem Nachweisantikörper reagieren (falsch positive Ergebnisse) oder undifferenzierte Tumorzellen das entsprechende Antigen nicht exprimieren (falsch negative Ergebnisse) (Pelkey 1996). Funke (1998) wertete in einer Metaanalyse den prognostischen Wert des immunzytologischen Nachweises sogenannter Mikrometastasen im Knochenmark für verschiedene solide Tumoren aus. Obwohl einige Studien eine Korrelation zwischen Mikrometastasen und Krankheitsverlauf gefunden hatten, ergab sich insgesamt ein unklares Bild.

Die immunzytologischen Ergebnisse regten eine Reihe von Untersuchungen über den Nachweis von Tumorzellen in Knochenmark, Blut oder Lymphknoten mittels PCR an (Pantel 2000). Man versprach sich von der PCR eine höhere Sensitivität (etwa 1-3 Größenordnungen), eine größere Aussagekraft der Ergebnisse sowie technische und ökonomische Vorteile und damit insgesamt eine leichter zu erringende klinische Relevanz (Ko 1998, Dimmler 2001). Im Unterschied zur Immunzytologie wird hier die nachzuweisende Zelle nicht „gesehen“, sondern indirekt über ihr genetisches Material detektiert. Prinzipiell lassen sich mittels PCR sowohl DNA- als auch in Form der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) RNA-Sequenzen nachweisen.

Der Tumorzell-Nachweis über DNA-Marker basiert auf dem Vorhandensein von tumorspezifischen Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen, z.B. k-ras Onkogen, p53 (Hardingham 1995, Denis 1997, Bustin 1998). Allerdings sind die genomischen Veränderungen mit Ausnahme des k-ras Onkogens, das in etwa 40-50% der Tumoren vorhanden ist, sehr vielfältig (Zippelius 2000a) und würden in jedem Fall ein vorangehendes Screening des Primärtumors erfordern, was den Aufwand beträchtlich erhöhen würde. Von Nachteil ist weiterhin, daß DNA-Moleküle relativ stabil sind, so daß deren Nachweis nicht unbedingt die Existenz von vitalen Zellen in Blut oder Knochenmark zugrunde liegt (Mori 1998). Dennoch konnte gezeigt werden, daß der Nachweis von k-ras-Mutationen im peripheren Blut eindeutig von prognostischer Bedeutung ist (Hardingham 2000).

Alternativ dazu ist der Nachweis von RNA mittels RT-PCR aufgrund der ubiquitär vorhandenen RNasen sehr wahrscheinlich an die Existenz von vitalen Zellen gekoppelt (Jonas 1996, Ghossein 2000). Unterschiede in der Genexpression von Tumorzellen und derjenigen ihres zellulären Hintergrundes (z.B. hämatopoetischer Zellen) ermöglichen über die Detektion spezifischer mRNA-Sequenzen den Nachweis der Tumorzellen. Bahnbrechend war 1994 die Arbeit von Gerhardt, der die mRNA des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) in Knochenmarkaspiraten von Patienten mit gastrointestinalen und Mammakarzinomen nachgewiesen hatte. Die Ergebnisse ließen vermuten, daß die PCR als Nachweismethode für disseminierte Tumorzellen wesentlich sensitiver als die Immunzytochemie ist. Ähnlich hoffnungsvolle Ergebnisse erzielte Mori, der CEA-mRNA in Lymphknoten, Knochenmarkaspiraten sowie peripheren Blutproben nachwies (Mori 1995, 1996, 1998). Mit der Detektion von CEA-mRNA in Blutproben gesunder Kontrollpersonen entstanden allerdings Zweifel an der Spezifität der Methode (Ko 1998).

Weitere Untersuchungen mit CEA-mRNA und weiteren mRNA-Markern unter Zuhilfenahme der konventionellen RT-PCR lieferten widersprüchliche Ergebnisse sowohl bezüglich der Spezifität der Methode als auch der Häufigkeit des Auftretens der Transkripte in Blut oder

Knochenmark von Patienten (Soeth 1996, 1997, Denis 1997, Weitz 1998, Wyld 1998). Während in einigen Arbeiten der prozentuale Anteil des Transkriptnachweises in Korrelation zum Tumorstadium stand, war er in anderen Arbeiten auch für fortgeschrittene Tumorstadien eher gering, woraus die Idee entstand, mehrere Marker miteinander zu kombinieren (Futamura 1998, Wharton 1999, Kufer 2002). Zur Erklärung der Diskrepanzen wurden die bekannte Heterogenität der Zellen eines Tumors sowohl auf genetischer als auch epigenetischer Ebene zum Zeitpunkt der Diagnose (Bustin 1998) sowie die entsprechenden Unterschiede zwischen den Tumoren verschiedener Patienten herangezogen. Die Heterogenität innerhalb eines Tumors kann z.B. aus einer genetischen Instabilität oder einer komplexen Interaktion der Tumorzellen mit ihrer unmittelbaren Umgebung (Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Hypoxie, Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion) resultieren (Violette 2003). Selbst verlässliche Tumormarker wie CEA werden in 5% der Tumoren nicht exprimiert (Goldenberg 1976, Guadagni 2001). Neben qualitativen Unterschieden spielen auch rein quantitative Differenzen, z.B. durch eine eventuelle Downregulation des Zielgenes aufgrund einer Therapie oder der Existenz niedrig differenzierter Teilpopulationen, eine Rolle (Wharton 1999, Ghossein 2000).

Der reproduzierbare Nachweis von normalerweise für epitheliale Zellen bzw. Tumorzellen spezifischen Transkripten im Blut gesunder Kontrollpersonen ließ die Frage nach deren Ursache aufkommen (Van Eekelen 2000). Man vermutet entweder eine geringfügige Expression dieser Gene in hämatopoetischen Zellen („illegitimate transcription“) oder in epithelialen Zellen, die aufgrund eines entzündlichen Geschehens ins Blut eingeschwemmt wurden (Jonas 1996, Zipelius 1997, Ko 1998, Jung 1998, Hardingham 2000) oder eine Verunreinigung mit Hautzellen (Castells 1998). Diese sogenannte Hintergrundexpression erschwert den Nachweis von Tumorzellen erheblich. Dies gilt insbesondere für den rein qualitativen Nachweis mit der konventionellen PCR.

1.5 Die Methode der RT-PCR zum Nachweis disseminierter Tumorzellen

Ein Großteil der Arbeiten zum Gebiet der MRD wurden mit der konventionellen RT-PCR durchgeführt. Dabei besteht keine Möglichkeit, den Verlauf der PCR-Zyklen zu beobachten. Das PCR-Produkt wird lediglich als mit Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemachte Bande auf einem Gel dargestellt (Burchill 1995, Soeth 1997, Weitz 1998). Die konventionelle PCR wird häufig in einer ineinandergeschachtelten Form („nested“ PCR) angewendet, um die Sensitivität zu erhöhen. Das Extrem bildet eine Schachtelung von drei PCR-Läufen (Funaki 1997).

Neben dem erhöhten Aufwand besteht auch ein nicht zu vernachlässigendes Kontaminationsrisiko (Bustin 1998). Im Widerspruch dazu steht die Forderung nach einer Sensitivitätsminderung aufgrund der Hintergrundexpression in hämatopoetischen Zellen, z.B. in Form der Reduktion der Anzahl der PCR-Zyklen oder des Probenvolumens, um die Spezifität in einem vernünftigen Bereich zu gewährleisten (Ko 1998, Park 2001). Weiterhin gibt es Hinweise aus überzeugenden Studien, daß durch optimale Einstellung der PCR-Parameter die erforderliche Sensitivität auch in einfachen PCR-Läufen erreicht werden kann (Bustin 1998, Hardingham 2000, Zippelius 2000b). Alternativ dazu wurden Methoden entwickelt, um auch mittels der konventionellen PCR semiquantitative Ergebnisse (Kim 1999) bzw. unter Einbeziehung weiterer Methoden auch quantitative Ergebnisse zu erhalten (Funaki 2000, Van Eekelen 2000).

Die seit einiger Zeit etablierte Methode der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) gestattet eine exakte Quantifizierung der Anzahl der Transkripte in einer Probe relativ zu einem internen oder externen Standard (Freeman 1999, Dimmler 2001, Max 2001, Klein 2002). Mit dieser Technologie wird die gesamte PCR-Reaktion mittels Fluoreszenzfarbstoffen zeitgleich verfolgt und der Beginn der exponentiellen Phase als verlässlichster Bereich zur Bestimmung der Probenkonzentration gemessen. Durch die Quantifizierung der Hintergrundexpression in Kontrollproben und die Definition von Grenzwerten kann damit die Spezifität der Methode bei gleichbleibender Sensitivität deutlich erhöht werden (Bustin 1998, 1999, Dimmler 2001, Straub 2001, Ito 2002). Weiterhin können neben tumortypischen Transkripten auch solche von Haushaltsgenen („House Keeping“-Genen = HKG), d.h. von Genen mit annähernd konstanter und gut quantifizierbarer Expression in den zu untersuchenden Zellen, bestimmt werden. Einige typische Vertreter dieser Gen-Gruppe sind Porphobilinogen-Desaminase (PBGD), Glycerinaldehyd-Dehydrogenase (GAPDH), β 2-Mikroglobulin, Cyclophilin und β -Aktin (Medhurst 2000, Soong 2001, Bustin 2002, Lupberger 2002). HKG können als interner Standard einer Probe genutzt werden, um die Qualität jeder einzelnen Probe zu evaluieren (Kruse 1997, Keilholz 1998, Medhurst 2000). Erfasst werden damit Variationen durch Proben-Konservierung, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, PCR-Effizienz und PCR-Inhibitoren (Ghossein 2000). Mit den HKG eröffnet sich die Möglichkeit, die Anzahl der Transkripte des Marker-Gens auf einen inneren Standard zu beziehen und die Vergleichbarkeit verschiedener Proben realistischer zu gestalten.

1.6 Marker beim kolorektalen Karzinom

Ein kritischer Punkt der Methodologie ist die Selektion eines geeigneten Markers. Zum einen wurde versucht, die mRNA von Tumormarkern, die als Protein zur Früherkennung oder Verlaufskontrolle eingesetzt werden, zu detektieren. Andere Ansätze beinhalten eine mehr oder weniger systematische Suche nach neuen Zielantigenen entweder auf dem Proteinniveau oder dem der Transkription. Traditionell wurden Mäuse mit Tumorzellen oder Tumorzellextrakten immunisiert, um über die Bildung entsprechender Antikörper typische Oberflächenantigene zu erkennen. Neuere Methoden umfassen die Isolierung Tumorzellantigen-erkennender T-Zellen, die Entwicklung gewebstypischer cDNA-Bibliotheken durch Klonierung der isolierten und in cDNA umgeschriebenen mRNA, die Mikroarray-Technik sowie die Identifikation von Oberflächenantigenen mittels Antikörper-Bibliotheken von Bakteriophagen (Liang 1992, Boon 1996, Yang 1999, Hartupée 2001, Roovers 2001, Ramaswamy 2003). Ideal wäre die Identifikation eines tumorspezifischen Markers oder einer entsprechenden Markerkombination. Dieses Ziel ist bisher selten erreicht (z.B. Tyrosinase beim malignen Melanom), da der Marker entweder spezifisch, wie im Falle einer Tumor-spezifischen Mutation, aber dafür nur in einer Subpopulation von Tumoren nachweisbar ist, oder die Marker lediglich Tumor-assoziiert oder auch nur gewebsspezifisch (z.B. Marker für epitheliale Zellen) sind.

Für das kolorektale Karzinom wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt kein spezifischer Tumormarker gefunden (Bustin 1999). Bisher wurde eine Vielzahl von mRNA-Markern untersucht: CEA, diverse Zytokeratine (CK8, CK9, CK18, CK19, CK20), CD44-Rezeptor, Guanyl-Cyclase C, Mucin I/II, MAGE-A, EGFR („epidermal growth factor receptor“), u.a. (Burchill 1995, Bustin 1999, De Luca 2000, Hardingham 2000, Masson 2000, Bustin 2002, Kufer 2002). Der Wert der meisten Marker bleibt aber bis jetzt unklar. Im folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Marker näher dargestellt werden.

CEA ist ein häufig benutzter Tumormarker in der Verlaufskontrolle von kolorektalen Karzinomen. Die CEA-Gen-Familie enthält 29 Gene auf dem langen Arm des Chromosoms 19 und gehört zur Immunglobulin Superfamilie (Thompson 1994, Guadagni 1997). CEA ist ein Zelloberflächenprotein und wird konstitutiv in Dickdarmmukosazellen exprimiert. Die Expression in entsprechendem Tumorgewebe ist meist höher (Schrewe 1990). Es wird u.a. in etwa 95% der kolorektalen, Magen- und Pankreaskarzinome, der Mehrzahl der kleinzelligen Lungenkarzinome sowie in etwa 50% der Mammakarzinome exprimiert (Guadagni 2001). In vielen Arbeiten wurde die von Gerhard (1994) entwickelte Nachweismethode von CEA-mRNA mittels RT-PCR genutzt oder aber eigene PCR-Primer etabliert, um CEA-exprimierende Zellen in Lymph-

knoten, Knochenmark und peripherem Blut nachzuweisen (Gerhard 1994, Mori 1995, 1996, 1998, Neumaier 1995, Jonas 1996, Zippelius 1997, Ko 1998, Zhong 1999).

Zytokeratine (CK) werden vorwiegend in epithelialen Zellen exprimiert und zeigen ein striktes Linien- und Differenzierungs-bezogenes Muster. Maligne Zellen behalten die Intermediärfilamente ihrer Ursprungszellen, so daß CKs genutzt werden können, um Tumorzellen epithelialen Ursprungs zu charakterisieren (Moll 1992, 1993, Gerhard 1994, Burchill 1995, Mori 1995, 1996, Soeth 1996, Castells 1998, Futamura 1998, Chausovsky 1999, Wharton 1999, Zhong 2000, Dimmler 2001). Die Expression von CK20 ist fast vollständig auf epitheliale Zellen des Gastrointestinaltraktes, des Urothels, sowie Merkelzellen und ihre malignen Entsprechungen beschränkt (Moll 1992). Andere Adenokarzinome wie z.B. Mamma-, Lungen-, Haut- sowie Endometriumkarzinome zeigen angeblich keine CK20-Expression. Allerdings wurden in verschiedenen Studien kontroverse Ergebnisse gefunden, die die erhoffte Spezifität von CK20 in Frage stellen (Soeth 1997, Weitz 1998, Wyld 1998, Bustin 1999, Champelovier 1999, Wharton 1999, Soong 2001).

Weitere, bisher noch nicht mit der RT-PCR-Methode untersuchte Zielantigene sind die Protease M (ProtM), das Wilms-Tumor-Gen (WT1), das Zelloberflächenantigen A33 sowie das Regenerationsgen RegIV. Kürzlich wurde das Gen einer Trypsin-ähnlichen Serinprotease (Protease M, Zyme, Neurosin) identifiziert, die eine starke Expression in Kolonkarzinomzelllinien aufweist (Anisowicz 1996, Yamashiro 1997). Sie gehört zum auf dem Chromosom 19q13 lokalisierten Gen-Cluster der Serinproteasen (Gan 2000). Neben Kolonkarzinomzelllinien konnte die entsprechende mRNA auch aus Ovarialkarzinomzelllinien sowie einer Vielzahl von Geweben isoliert werden (Yousef 1999). Aufgrund der Sequenzhomologie mit verschiedenen Kallikreinen und dem Prostata-spezifischen Antigen wird vermutet, das sie eine Rolle in der Tumordiagnostik spielen könnte (Anisowicz 1996).

Ein weiterhin potentiell interessanter Tumormarker ist das Wilms-Tumor-Gen, von dem kürzlich gezeigt werden konnte, daß es auch in Zelllinien diverser solider Tumoren exprimiert wird (Oji 1999). WT1 kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Gewebstypen beeinflusst, permanent in leukämischen Blasten überexprimiert wird und damit sehr wahrscheinlich in den Prozeß der Onkogenese einbezogen ist (Menssen 2000). Der quantitative Nachweis von WT1-Transkripten wird erfolgreich zum Nachweis einer MRD bei verschiedenen Leukämien nach allogener Knochenmarkstransplantation sowie zum Monitoring der Krankheitsprogression beim myelodysplastischen Syndrom angewandt (Sugiyama 2001, Cilloni 2003, Garg 2003, Ogawa 2003). Das WT1-Gen hat in soliden

Tumoren und Leukämien eher die Funktion eines Onkogens als die eines Tumorsuppressorgens und spielt durch die Fähigkeit, zytotoxische Lymphozyten anzuziehen, eine Rolle in der gezielten Tumortherapie (Sugiyama 2001).

A33 ist ein Glykoprotein, das sich auf der Oberfläche von epithelialen Zellen des unteren Gastrointestinaltraktes sowie von 95% der Kolon- und Rektumkarzinome befindet. Die Funktion dieses Oberflächenproteins im Zellstoffwechsel ist unbekannt. Der Fakt, daß Antikörper gegen Epitope dieses Proteins wesentlich länger an Tumorzellen als an normale epitheliale Zellen des Gastrointestinaltraktes gebunden bleiben, ließ dieses Protein als geeignetes Zielantigen einer gegen Tumorzellen gerichteten Antikörpertherapie erscheinen. Bisher wurden reine oder mit radioaktiven Substanzen gekoppelte Antikörper in klinischen Phase I bis III-Studien untersucht. Dabei wurde durchaus ein Ansprechen der Therapie bei einigen, vielfach vorbehandelten Patienten erreicht, wobei der Mechanismus der Antitumoraktivität noch unklar ist. Problematisch sind auch die immunologischen Nebenwirkungen, die die Anwendung dieser Therapieform z.Z. noch limitieren (Welt 2003).

Humane Reg- und Reg-bezogene Gene bilden eine Multigenfamilie, die zum Typ der Kalzium-bindenden Lektin-Superfamilie gehören. Reg-Gene (=Regeneration Gene) werden im proximalen Gastrointestinaltrakt und ektopisch in anderen Lokalisationen beim Vorliegen von Gewebsverletzungen exprimiert. Reg-Gene werden auch ektopisch in Kolonkarzinomen exprimiert, und es gibt Hinweise dafür, daß die erhöhte Expression mit einer schlechteren Prognose korreliert. Ein neues Mitglied dieser Gen-Familie, RegIV, wurde kürzlich im Rahmen einer Expressionsanalyse von Gewebeproben aus chronisch entzündlich veränderter Darmschleimhaut identifiziert (Hartupee 2001). RegIV wird nur gering in normaler Kolonschleimhaut, aber vermehrt in kolorektalen Tumoren und im Dünndarm exprimiert. Eine besonders hohe Expression wurde in chemotherapieresistenten Kolonkarzinomzelllinien gefunden (Violette 2003). Die Expression von Genen der Reg-Familie ist neben der Chemotherapieresistenz auch im Zusammenhang mit proliferativen und regenerativen Prozessen erhöht. Reg-Gene scheinen das Überleben einer Zelle, Zelladhäsionsprozesse sowie die Apoptose zu beeinflussen. Der kausale Mechanismus jedoch ist bisher ungeklärt (Violette 2003).

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit besteht in einer Evaluation der Methode der quantitativen RT-PCR für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen in Blut und Knochenmark von Patienten mit

kolorektalem Karzinom. Die quantitative RT-PCR wird benutzt, um die Expressionsniveaus verschiedener mRNA-Marker (ProtM, CEA, CK20, WT1, A33, Reg IV) zu quantifizieren und zu vergleichen sowie die Hintergrundexpression der interessierenden Marker im Blut oder Knochenmark von derjenigen zu unterscheiden, die von epithelialen oder Tumorzellen stammen könnte.

Im ersten Teil der Arbeit werden die methodischen Grundlagen erarbeitet. Dazu zählen:

- Optimierung der Aufarbeitungsmethoden
- Etablierung der PCR-Bedingungen für verschiedene mRNA-Marker
- Vergleich der PCR-Sensitivität von einfacher und ineinandergeschachtelter Form
- Untersuchung des quantitativen Meßbereiches verschiedener Marker
- Festlegung der in vitro Sensitivität der Methode in „recovery“-Experimenten
- Untersuchung der Eignung von Haushaltsgenen

Im zweiten Teil wird die Methode zur Untersuchung von Gewebeproben, Zelllinien, Blutproben sowie Knochenmarkproben angewandt:

- Quantifizierung der Expression der Marker in Gewebeproben und verschiedenen Tumorzelllinien
- Quantifizierung der Hintergrundexpression in Blut und Knochenmark von gesunden Spendern und Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Infektionserkrankungen
- Untersuchung der Markerexpression in peripheren Blutproben eines großen Patientenkollektivs
- Untersuchung der Markerexpression in Knochenmarkproben einiger Patienten sowie immunzytologische Auswertung von Knochenmarkausstrichen der entsprechenden Proben als Vergleichsmethode

Abschließend soll die Frage diskutiert werden, ob die Anwendung der quantitativen RT-PCR Licht in die Vielfalt der vorwiegend mit konventioneller PCR gewonnenen Ergebnisse bringen kann.