

4. Diskussion

4.1 Durchgeführte Experimente

In dieser Arbeit wendeten wir die Methode der Real time on-line Nested RT-PCR an, um zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom nachzuweisen. Als Tumormarker wählten wir Protease M-, Ccsg1- und CEA-mRNA aus. Wir führten eine Reihe von Titrationsexperimenten durch, um die Sensitivität unseres Ansatzes abzuschätzen (Jonas et al. 1996). Dann untersuchten wir mit unserem Ansatz gesundes und neoplastisches Kolongewebe, sowie Gesund- und Patiententenblut. Wir klonierten die natürlichen und künstlichen Targets von Protease M und CEA, verdünnten sie seriell und erstellten Standardkurven, um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen.

4.2 Methodenkritik

4.2.1 Angewendete PCR-Methode

Um zirkulierende Tumorzellen nachzuweisen, bedienten wir uns der Methode der Real time on-line Nested Reversen Transkriptions Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Unter der Fülle von Arbeiten, die sich mit dem Nachweis von Tumorzellen beschäftigen, beschreiben wir damit als eine der ersten Arbeitsgruppen die Anwendung dieser neuen Methode. Zahlreiche Arbeiten zum Nachweis kolorektaler Tumorzellen mittels der konventionellen Nested (RT-)PCR sind inzwischen veröffentlicht worden (Gerhard et al. 1994, Mori et al. 1995, Jonas et al. 1996, Castells et al. 1998, Liefers et al. 1998, Ko et al. 1998). Die Methode der RT-PCR wie auch andere Methoden zum Nachweis von Tumorzellen sind in der Literatur beschrieben und verglichen worden. Bei Raj et al. 1998 und bei Pantel et al. 1999 finden sich Übersichten zum Nachweis von Tumorzellen, in denen verschiedene Methoden, Tumoren und Nachweismedien miteinander verglichen werden. Der Tumorzellnachweis in peripherem Blut wird bei Raj et al. 1998 und Pantel et al. 1999 besprochen. Übersichtsarbeiten zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen in Patienten mit kolorektalem Karzinom finden sich bei Raj et al. 1998, Pantel et al. 1999 und Ko et al. 1998.

4.2.2 Sensitivität

Bei den Titrationsexperimenten deutete sich an, daß Protease M cDNA von COLO 206F Zellen, die in 10ml Blut verteilt sind, bis zu einer Grenze von 10 Zellen nachgewiesen werden konnte. Dieses Detektionslimit lag für Ccsg1-mRNA bei 10^5 Zellen und für CEA-mRNA bei 10^3 Zellen (ohne zugegebene Vektorzellen). Diese Nachweisgrenze änderte sich für Ccsg1 und Protease M nicht, nachdem 10^4 Kontrollzellen zugegeben wurden. Damit konnten wir eine Tumorzelle in ungefähr 10^6 Leukozyten nachweisen, unter der Annahme, daß in 10ml Vollblut ca. 10^7 Leukozyten zu finden sind (Reinhold et al. 1996, Castells et al. 1998). Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Erfahrungen, daß mit Hilfe eines Nested PCR Ansatzes, abhängig vom Protokoll und der verwendeten Tumorzelllinie, eine einzelne kolorektale Tumorzelle in 10^5 bis 10^7 mononukleären Zellen nachgewiesen werden kann (Ko et al. 1998). Es wurde erwähnt, daß die Sensitivität in Titrationsexperimenten wahrscheinlich die tatsächlichen Gegebenheiten in vivo überschätzt. Um herauszufinden, ob sich dies bei uns auch so verhält, müßte man wahrscheinlich in neuen Experimenten unter Verwendung der von uns erstellten Standardverdünnungen die absoluten Ergebnisse der Titrationsexperimente mit denen der Blutproben der Patienten vergleichen. Bei den Standardkurven stellte sich heraus, daß Protease M zwei Titerstufen früher detektiert werden konnte als CEA. In dieser Situation war Protease M also sensitiver als CEA. Bei den Gewebeproben lassen unsere Ergebnisse darauf schließen, daß Protease M in neoplastischem Kolongewebe durchschnittlich stärker exprimiert wird als in gesundem. CEA wurde in gesundem und neoplastischem Kolongewebe durchschnittlich gleich stark und im Vergleich zu Protease M stärker exprimiert. Die Expression sowohl von CEA als auch von Protease M variiert aber in beiden Geweben stark. (Mafune et al. 1992, siehe auch: Jonas et al. 1996, Bustin et al. 1999). Daß die Expression an CEA mRNA nicht mit der Metastasierung korreliert, wurde bereits in anderen Arbeiten erwähnt (Mafune et al. 1992, Jonas et al. 1996). Die Nested PCR muß nicht unbedingt sensitiver als die konventionelle PCR sein (Novaes et al. 1997). In unserer Arbeit war dies allerdings wie auch in zahlreichen anderen Berichten (Foss et al. 1995, Keilholz et al. 1998, Ko et al. 1998) der Fall.

Die extreme Sensitivität der Nested PCR kann natürlich auch ihr größter Nachteil sein, weil schon kleinste Veränderungen in den Anfangsbedingungen exponentiell vergrößert werden (Jung et al. 1997). Wir werden im folgenden einige dieser möglichen Fehlerquellen diskutieren.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß eine extrem hohe Sensitivität insofern auch ein Nachteil sein könnte, als es dazu verleiten könnte, ein positives Ergebnis in der PCR direkt mit dem Risiko der Metastasierung zu korrelieren. Da weniger als 0.01% der zirkulierenden Tumorzellen einzelne Metastasen etablieren (Glaves et al. 1988), d.h. 10.000 zirkulierende Zellen eine Metastase ermöglichen, und in Untersuchungen beim Prostatakarzinom 1.000 Marker-produzierende Zellen nachgewiesen werden konnten, würde sich bei einer angenommenen Korrelation eine hohe Rate falsch-positiver Fälle ergeben. Die Grenze, ab der Positivität höheres Risiko bedeutet, muß insofern wahrscheinlich für jeden Tumor einzeln bestimmt werden (Raj et al. 1998).

Um zu gewährleisten, daß die Proben effizient aufgearbeitet wurden, setzten wir einen internen Standard ein (Willhauck et al. 1998). Die Ergebnisse der PCR-Läufe der künstlichen Targets (Vektor) von CEA und Protease M ließen uns vermuten, daß die Methode des internen Standards, mit den gleichen primer sites wie die des zu detektierenden Gens, für seltene Transkripte ungeeignet ist, weil es, insbesondere bei vielen Zyklen in der ersten Runde der Nested PCR, zu einer Konkurrenz zwischen natürlichem und künstlichem Target um die Bindungsstellen für die Primer kommt. Dennoch bleibt diese Form der internen Kontrolle der Aufarbeitung eine Option für häufigere Targets.

Um eine weitere Kontrolle der Aufarbeitung der Proben zu haben, wurden bei unseren Experimenten die cDNAs von β 2-Mikroglobulin (β 2m) bzw. Porphobilinogen Deaminase (PBG-D) als konstant transkribierte Gene (=Housekeeping Gene) eingesetzt (Watzinger et al. 1998).

β 2m besteht aus einer einzelnen, löslichen, Immunglobulin ähnlichen Domäne, die aus 100 Aminosäuren besteht und die von dem großen, zweiten Exon des β 2m Gens kodiert wird. Es ist ein ca. 11,8kD schweres Polypeptid, welches das Leichtkettenprotein der HLA-Klasse-I-Antigene darstellt. Als solches befindet es sich auf der Zellmembran aller kernhaltigen Zellen. β 2m wird beim Gesunden in relativ

konstanter Rate gebildet und im Rahmen der natürlichen Zellregeneration in alle Körperflüssigkeiten abgegeben. Sein Molekulargewicht beträgt ca. 34.000. Seine Peptidkette ist zwischen der AS 25 und 81 über eine Disulfidbrücke verbunden. Bei allen Erkrankungen, die mit einer Aktivierung des Immunsystems einhergehen, ist die β 2m-Bildung erhöht. Es wird hauptsächlich in Lymphozyten synthetisiert. Da uns nur die DNA-Sequenz von β 2m vorlag, erschien es uns nicht möglich, Primer zu bauen, die wenigstens ein Intron umspannen würden. β 2m ist auch in freier Form biologisch aktiv. (Zu β 2m siehe auch: Peterson et al. 1977, Cunningham et Berggard 1974, Suggs et al. 1981).

Porphobilinogen Deaminase (PBG-D) ist das dritte Enzym der Hämbiosynthese in den Erythrozyten. Sein Gen liegt auf dem Chromosom 11q23-11qter. Es verfügt über 15 Exons, die sich über 10kb DNA erstrecken. Das kodierende Gen besitzt zwei Promotoren, die nahe beieinander liegen. Alternatives Spleißen des Transkripts ergibt zwei spezifische mRNA-Spezies, respektive zwei Isoformen des Proteins. Der stromaufwärts gelegene Promotor initiiert die Transkription der housekeeping Isoform, die von den Exons 1 und 3 bis 15 kodiert wird. Die zweite Isoform des Proteins ist spezifisch für Erythrozyten (Grandchamp et al. 1987, Finke et al. 1993, Cardala et al. 1998). Für PBG-D wurden bisher keine prozessierten Pseudogene erwähnt.

Im Vergleich zu den künstlichen Targets von Protease M und CEA streuten die Crossing Points von PBG-D weniger. Dabei ließ sich kein wesentlicher Unterschied in der Streubreite zwischen den Patienten ohne und denen mit Chemotherapie feststellen. Anscheinend wurde die Expression von PBG-D weder durch die Chemotherapie noch durch den fortgeschrittenen neoplastischen Prozeß wesentlich verändert (Cox et al. 1991). Eine Empfehlung für einen internen Standard und gegen PBG-D als Möglichkeit zur Normalisierung kann im Kontext unserer Arbeit also nicht ausgesprochen werden.

4.2.3 Spezifität

Obwohl Probleme mit der Spezifität für die konventionelle PCR, und insbesondere für die Nested PCR immer wieder ein Thema sind, muß dennoch zunächst auf die wesentlichen Vorteile der PCR im LightCycler in dieser Hinsicht eingegangen werden.

Aufgrund der Spezifität der Sonden, die aufgrund ihrer Sequenz tatsächlich nur an die Zielsequenz anbinden können, wird verhindert, daß die gemessene Fluoreszenz von anderen Sequenzen stammen könnte. Außerdem entfällt ein weiterer Schritt bei dem eine Kontamination auftreten könnte, indem die Quantifizierung während des Amplifikationsprozesses erfolgt. Trotzdem sollen hier noch einmal die klassischen Probleme der konventionellen PCR behandelt werden.

Kreuzkontaminationen sind eine der hauptsächlichen Ursachen für falsch-positive Resultate. Dies gilt insbesondere für die Nested PCR, bei der solche Kontaminationen im Vergleich zur single round PCR erheblich wahrscheinlicher sind. Der Transfer von 0,1µl PCR-Amplifikat enthält um die 10^9 Kopien (Kwok et al. 1989). Kreuzkontaminationen lassen sich in der Gelelektrophorese nicht detektieren, weil das Amplifikat die gleiche Länge wie das erwünschte Produkt hat.

Kontaminationen sind auch durch genomische DNA möglich. Jede Probe, aus der wir RNA extrahierten, wurde zwar mit DNase verdaut, doch unternahmen wir vorab keine Experimente, um ihre Effizienz zu belegen. Wir halten es für wahrscheinlich, daß obwohl wir in keiner Gelelektrophorese der extrahierten RNAs DNA entdecken konnten, geringe Mengen genomischer DNA vorhanden waren. Darauf lassen die Ergebnisse der von uns eingesetzten -RT-Kontrollen schließen. Diese Kontrollen waren bei mindestens der Hälfte der Blutproben der Patienten, für mindestens einen der Marker oder dem Housekeeping Gen, positiv. Selbst bei denjenigen Proben, bei denen die -RT-Kontrolle von CEA in der PCR negativ war, könnte eine Kontamination durch genomische DNA vorliegen. Denn zwischen den Primern, die wir für CEA verwendet haben, liegt ein ca. 2,0kb großes Intron, was eine Amplifikation aufgrund seiner Größe möglicherweise verhindert hätte.

Illegitime Transkription beschreibt die generalisierte Präsenz sehr geringer Mengen jeden gewebsspezifischen Transkripts in jeder Zelle (Chelly et al. 1989, Kaplan et al. 1992). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, daß es in peripherem Blut keine illegitime Transkription von Protease M gibt, weil unsere Arbeitsgruppe in Gesundblut keine Protease M-mRNA nachweisen konnte (unveröffentlicht).

Prozessierte Pseudogene (Retro-Pseudogene) gleichen in ihren Sequenzen den hintereinandergeschalteten Exons der entsprechenden echten Gene. Sie sind aus revers transkribierter mRNA entstanden. Selten sind solche Pseudogene nicht,

doch kommen sie nicht bei allen Genen vor. Für GAPDH und β -Actin werden 25 bzw. 20 erwähnt (Knippers et al. 1995). Obwohl für Protease M noch keine prozessierten Pseudogene erwähnt wurden, muß auch hier eine Vervielfältigung solcher Gene, so wie es z.B. für Cytokeratin 19 erwähnt wurde, als Quelle falsch-positiver Resultate in Betracht gezogen werden.

Als eine weitere Quelle falsch-positiver Ergebnisse wurde die Produktion von CEA-mRNA durch epitheliale Zellen, die von der Haut abgeschert werden und so in die Venenpunktionskanüle gelangen können, erwähnt (Jonas et al. 1996). Ob Protease M in der Haut exprimiert wird bleibt offen. Falsch-positive Fälle dieser Art könnten z.B. dadurch vermieden werden, daß die erste Blutprobe bei der Blutabnahme verworfen wird und erst die folgenden als Untersuchungsgut dienen (Keilholz et al.).

4.2.4 Quantifizierung der RT-PCR-Amplifikate

Die Vorhersagekraft der konventionellen RT-PCR wird auch durch die Schwierigkeit ihrer Quantifizierung limitiert (Foley et al. 1993, Bustin et al. 1999). Durch die Entwicklung der Real time on-line PCR wurde die Methode der quantitativen PCR wesentlich vereinfacht. Bei dieser Form der PCR wird die Fluoreszenz von Sonden, die an das Amplifikat binden, kontinuierlich während der Vervielfältigung gemessen. Um eine Real-time PCR durchzuführen, zogen wir einen LightCycler (Roche Diagnostics GmbH) heran. Dieser LightCycler besteht aus einem schnellen Thermocycler und einem Fluorimeter, das die Fluoreszenz in den maximal 32 kleinen Glaskapillaren während des Prozesses der Amplifizierung mißt (Wittwer et al. 1997). Die meisten Veröffentlichungen in denen der LightCycler benutzt wurde, behandeln die Diagnostik der Leukämien. Zum Tumorzellnachweis wurde er bisher kaum eingesetzt. Kürzlich wurde er zum Nachweis von kolorektalen Tumorzellen in der Peritonealflüssigkeit benutzt (Nakanishi et al. 1999) und erlaubte dabei eine verlässliche Quantifizierung der RT-PCR.

Um die mRNA-Menge absolut quantifizieren zu können, erstellten wir Standardkurven für die in vitro Transkripte von Protease M und CEA. Für diese Transkripte berechnete uns die LightCycler Software absolute Massen. Wir gehen davon aus, daß diese Transkripte es in weiteren Versuchen ermöglicht hätten, die

absoluten Massen der mRNAs in den Patientenproben zu berechnen. Diese Art der Quantifizierung ist einer konventionellen Methode wie z.B. der kompetitiven PCR deutlich überlegen.

4.2.5 Standardisierung der Methode

Obwohl die Zahl der Arbeiten zum Tumorzellnachweis stetig ansteigt, werden diese Arbeiten dem Patienten erst dann dienen können, wenn die Methoden standardisiert werden, damit größere Studien und den Vergleich zwischen verschiedenen Laboren ermöglichen und letztendlich die adjuvante Therapie auf die Studienergebnisse hin moduliert wird (Bustin et al. 1998, Kvalheim 1998). Wir glauben, daß ein Real-time PCR Ansatz, wie wir ihn benutzt haben, gegenüber der konventionellen PCR genug Vorteile bietet, um sich für eine Standardisierung anzubieten.

4.2.6 Untersuchungsgut

Um im weiteren Studienverlauf Aussagen über Patienten ohne Metastasen erheben zu können, untersuchten wir zunächst solche mit metastasiertem kolorektalem Karzinom. Die ersten 16 Patienten standen zum Zeitpunkt der Blutabnahme unter Chemotherapie. In der Literatur wurde berichtet, daß bei Patienten mit malignem Melanom, die zum Untersuchungszeitpunkt unter Chemotherapie standen, nur sehr selten zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden konnten (Brossart et al. 1995). Wir untersuchten deshalb zusätzlich Patienten, die nicht unter Chemotherapie standen. Auch wir bestätigen, daß die Rate nachgewiesener Tumorzellen bei den Patienten, die nicht unter Chemotherapie standen, höher war als bei denen mit Chemotherapie.

Da der Tumorzellverkehr vermutlich intermittierend verläuft (Glaves et al. 1988), wäre es am besten, wenn mehrere Proben eines Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden würden (Jonas et al. 1997), z.B. zweimal innerhalb einer Kreislaufumlaufzeit (<3min). Die Abwesenheit von lebensfähigen Tumorzellen könnte bei Patienten mit nicht-aggressiven kolorektalen Lebermetastasen vermutet werden (Steele et al. 1989, Jonas et al. 1996). Es könnte interessant sein, postoperative mit präoperativen Blutproben zu vergleichen, weil der Nachweis von

Tumorzellen in beiden Fällen unterschiedlich gedeutet werden könnte (O'Sullivan et al. 1997).

4.3 Methodische Verbesserungsvorschläge

Da versteckte Tumorzellen im peripheren Blut sehr selten sind, wäre die Anreicherung dieser Zellen eine Option für die Zukunft (Kvalheim 1998, Pantel et al. 1999). Weitergehende methodische Fortschritte könnten im Etablieren einer Multiplex RT-PCR oder in der single-tube RT-PCR mit Tth Polymerase (Erlich et al. 1991, Bustin et al. 1998) bestehen. Allerdings hat sich die Tth Polymerase in einigen Fällen als weniger effizient als die konventionelle Methode mit zwei separaten Gefäßen herausgestellt. Für eine Multiplex-PCR eignet sich der LightCycler in hervorragender Weise, da bis zu drei verschiedene Wellenlängen von drei verschiedenen Sonden gleichzeitig detektiert werden können.

4.4 mRNA-Tumormarker für den Nachweis kolorektaler Tumorzellen

In unserer Arbeit untersuchten wir die Tumormarker CEA-mRNA, Ccsg1-mRNA und Protease M-mRNA. RT-PCR Ansätze zum Tumorzellnachweis werden natürlich auch durch die Marker limitiert, die zur Detektion verwendet werden. Zahlreiche Tumormarker sind bereits als Objekte der Nested PCR untersucht worden. Auch eine Kombination verschiedener Marker wurde vorgeschlagen (Liefers et al. 1999).

4.4.1 CEA

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) wurde von Gold et al. 1965 zum ersten Mal beschrieben. 1969 beschrieben Thomson et al. einen Radioimmunoassay für zirkulierendes CEA. Sein Gen liegt auf dem Chromosom 19q13.2. Es ist ein Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von ca. 50% und einer relativen Molmasse von 180kD. Es kommt in der kolorektalen Schleimhaut vor. Dort nimmt seine Synthese zwischen der neunten und 14. Schwangerschaftswoche zu und hält sich dann annähernd konstant. Im kolorektalen Karzinom und seinen Lebermetastasen liegt es 500mal konzentrierter als in der normalen

Kolonschleimhaut vor, obwohl dies nicht mit einer signifikant verschiedenen mRNA-Expression einhergeht. Dieses Phänomen ist derzeit Gegenstand der Forschung. In Magen-, Mamma- und Bronchialkarzinom akkumuliert CEA, allerdings lange nicht so deutlich wie im kolorektalen Karzinom. Lange Zeit bot der Serumspiegel an CEA bei kolorektalem Karzinom den frühesten Anhalt eines Tumorrezidivs (Kelly et al. 1992) und stellte sich zudem als besonders kosten-effektiv heraus (Deveney et Way 1984, Graham et al. 1998). Das Gen für CEA gehört zu einer Genfamilie, die 18 transkriptionell aktive Gene mit hoher Strukturhomologie umfaßt. Die hauptsächliche Aufgabe von CEA ist es wohl, die Glykokalix mit zu strukturieren.

CEA bietet als Marker zum Nachweis kolorektaler Tumorzellen Vor- und Nachteile. Es wurde bereits oft zum Nachweis kolorektaler Tumorzellen verwendet (Gerhard et al. 1994, Mori et al. 1996, Jonas et al. 1996, Castells et al. 1998, Liefers et al. 1998, Ko et al. 1998, Noh et al. 1999), und bietet damit eine zumindest grobe Vergleichsmöglichkeit für unsere Ergebnisse an. CEA wird in dem ganz überwiegenden Teil aller kolorektalen Tumoren in großen Mengen exprimiert (Shively et al. 1985, Zimmermann et al. 1987, Hammarström 1999). Doch variiert die Expression der CEA-mRNA sehr stark (Mafune et al. 1992). Sie ist nicht tumorspezifisch und wurde auch von uns in Gesundblut nachgewiesen. CEA wird in diversen Epithelien exprimiert (Hammarström 1999).

4.4.2 Ccsg 1

Colon carcinoma specific gene 1(Ccsg 1) gehört zu einer Sequenzpool-Datei. Ccsg1-mRNA konnte von uns in Gesundblut nicht nachgewiesen werden. Sie ist nicht tumorspezifisch. Ccsg1 wurde von uns ausgewählt, um zu prüfen ob sich hierin ein sensitiver und spezifischer Tumormarker finden lassen würde.

4.4.3 Protease M

Protease M (GenBank/EMBL Data Bank Zugangsnummer U62801) gehört zu den Kallikreinen, einer Subfamilie der Serinproteasen. Sein Gen, PRSS9 (protease, serine, 9), wurde von drei verschiedenen Gruppen unabhängig voneinander kloniert (Anisowicz et al. 1996, Little et al. 1997, Yamashiro et al. 1997) und erhielt drei verschiedene Namen: Protease M/Zyme/Neurosin (Diamandis et al. 2000). Sein

Gen liegt auf dem Chromosom 19q13.3.-13.4. Es besteht aus sieben Exons, von denen zwei Exons der 5'-Region nicht transkribiert werden, und sechs dazwischen liegenden Introns. Es umfaßt 10,5kb und ergibt nach Prozessierung eine mRNA von ca. 1526 Nukleotiden Länge, exklusive eines Poly-A-Schwanzes. Das Gen wird vor allem in Gehirn, Niere, Brust, Ovar und Uterus exprimiert. Seine mRNA wird in einigen primären Brusttumorzelllinien, Ovarialkarzinomgewebe und -zelllinien überexprimiert. In metastatischen Brusttumorzelllinien wird es dramatisch herunterreguliert. Auch in Kolongewebe wird es herunterreguliert (Anisowicz et al. 1996). PRSS9 wird durch Steroidhormone zumindest in der Brusttumorzelllinie BT-474 hochreguliert (Yousef 1999). Es wurde als Marker primärer epithelialer Tumoren, insbesondere primärer Brust- und Eierstocktumoren vorgeschlagen. Anisowicz et al. fanden bis auf wenige Ausnahmen keine Protease M-mRNA in Zellen von kolorektalen Tumormetastasen. Auch in zwei Eierstockmetastasen eines primären kolorektalen Karzinoms konnten sie mit Northern Blotting keine Protease M-mRNA nachweisen. Sie nahmen in den beschriebenen Fällen eine transkriptionale und translationale Down-Regulation dieses Transkripts an (Anisowicz et al. 1996, Little et al. 1997). Die für Protease M erwähnte down Regulation in manchen Tumormetastasen könnte die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Resultate erhöhen (Cairns et al. 1999). Protease M-mRNA konnte von uns in Gesundblut nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der erwähnten Ergebnisse ist Protease M-mRNA zwar kein tumorspezifischer Marker, doch könnte sich eine relative Spezifität für einige wenige Tumoren herausstellen. Unsere Ergebnisse an Kolongewebe deuten darauf hin, daß Protease M in kolorektalem Tumorgewebe eher hochexprimiert wird.

Die in der Gelelektrophorese gefundene Bande in ca. 400bp Höhe könnte, angenommen daß sie tatsächlich gDNA darstellt, einen Hinweis auf die Länge des Introns 5 im PRSS 9 Gen geben. Zukünftige Untersuchungen werden dies explorieren müssen.

4.4.4 Andere Tumormarker

In der Literatur finden sich weitere Tumormarker zum Nachweis kolorektaler Tumorzellen: Cytokeratin 18 wurde nicht weiter als Tumormarker empfohlen,

nachdem ein Pseudogen auf DNA-Ebene gefunden wurde (Gerhard et al. 1994), Cytokeratin 20 (erforscht durch Burchill et al. 1995; Soeth et al. 1996, 1997; Denis et al. 1997; Nakamori et al. 1997; Wyld et al. 1998; Weitz et al. 1998, 1999; Bustin et al. 1999), das anfangs vielversprechend aussah, erwies sich als unzuverlässiger Marker (Bustin et al. 1999). Andere Studien beinhalteten Marker wie CD44 (Gotley et al. 1996, Wong et al. 1997), Guanylylzyklase C (Carrithers et al. 1996; Waldman et al. 1998; Bustin et al. 1999), mutiertes K-ras (Hardingham et al. 1995, Hayashi et al. 1995), Apolipoprotein AI (Normanno et al. 1998) oder Matrixmetalloproteinase 7 (matrilysin) (Ichikawa et al. 1998). (Übersicht siehe: Raj et al. 1998, Pantel et al. 1999)

4.5 Prognostische Signifikanz der zirkulierenden Tumorzellen

Welchen klinischen Wert hat der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen? Die Intravasation von lebensfähigen tumorigenen Zellen in den Blutkreislauf bildet einen kritischen Schritt in der metastatischen Kaskade, der zur Dissemination des Primärtumors führen kann (Nakamori et al. 1997). Doch die meisten dieser Zellen gehen im Kreislauf zugrunde. Aus Experimenten in Tiermodellen ist bekannt, daß nur 0.01% der Zellen tatsächlich Metastasen begründen. Werden Zellen im Kreislauf nachgewiesen, bedeutet dies also keineswegs, daß bereits eine Metastasierung stattgefunden hat. Auf der anderen Seite müssen selbst Patienten mit weit verstreuten metastatischen Ablagerungen keinen Hinweis auf im Blut zirkulierende Tumorzellen liefern (Foss et al. 1995). An dieser Stelle sei an die Probleme falsch-positiver aber auch falsch-negative Ergebnisse erinnert (Zetter et al. 1990, Raj et al. 1998). Es wurde angenommen, daß, während der präoperative Nachweis von Mikrometastasen einerseits nur eine vorübergehende Ausschüttung von Zellen, andererseits aber auch metastatisches Potential oder minimale Resterkrankung bedeuten kann, der postoperative nur das letztgenannte darstellen würde (O'Sullivan et al. 1997).

4.6 Schlußfolgerung

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.

Der mögliche klinische Wert des Tumorzellnachweises liegt sowohl in der Verbesserung der Prognostizierbarkeit des einzelnen Patienten, als auch prinzipiell in der Beurteilung seines Ansprechens auf eine bestimmte adjuvante Therapie (Liefers et al. 1999). Erst groß angelegte prospektive Studien werden zeigen können, ob Ansätzen wie dem von uns verfolgten, ein Platz in der klinischen Routine gebührt. Last but not least könnte unsere Arbeit ein weiterer Baustein im Puzzle des Metastasierungsprozesses im Allgemeinen sein.