Chirurgische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor Univ.-Prof. Dr. J.R. Siewert)

Prognostische Bedeutung der CEA- und CK 20-Detektion mittels RT-PCR in peritumoralen Lymphknoten von Patienten mit nodal negativem kolorektalen Karzinom im UICC-Stadium I und II

Patricia Maria Gloria Baier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:
1. Priv. -Doz. Dr. O.F.H. Nekarda
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 17.11.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.06.2004 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN 4
ABKÜRZUNGEN 5
1 EINLEITUNG 7
1.1 Kolorektales Karzinom 7
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie 7
1.1.2 Prognosefaktoren 9
2 STAND DER WISSENSCHAFT 12
2.1 Minimal residual disease (=MRD) 12
2.1.1 Definition und Kompartimente 12
2.1.2 Bedeutung der MRD 13
2.2 Detektionsmethoden 14
2.2.1 Verschiedene Methoden 14
2.2.2 RT-PCR und Primer 16
2.3 Therapieformen der MRD 20
3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 22
4 MATERIAL UND METHODIK 23
4.1 Material 23
4.1.1 Patientenkollektiv 23
4.1.2 Follow-up 25
4.1.3 Kontrollkollektiv 26
4.2 Methodik 28
4.2.1 Lymphknotenasservation 28
4.2.2 Kryomikrotomschnitte 28
4.2.3 Hämalaun-Eosin Färbung 29
4.2.4 Immunhistologische APAAP-Färbung 29
4.2.5 RNA Extraktion und Vermessung 30
4.2.6 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts 32
4.2.7 RT-PCR und Primer 33
4.2.8 Ethidiumbromidgel-Elektrophorese 34
4.2.9 Sequenzierung 34
4.3 Statistische Auswertung 36
5 ERGEBNISSE 37
5.1 Sensitivität und Spezifität der Methode 37
5.2 Ck 20 RT-PCR 37
5.2.1 Detektionshäufigkeiten 37
5.2.2 Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern 38
5.2.3 Rezidivauftreten und Überleben 39
5.2.4 Univariate und multivariate Analyse 40
5.3 CEA RT-PCR 41
5.3.1 Detektionshäufigkeiten 41
5.3.2 Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern 42
5.3.3 Rezidivauftreten und Überleben 42
5.3.4 Univariate und multivariate Analyse 43
5.4 Vergleich der CEA- und Ck 20 RT-PCR 44
5.4.1 Detektionshäufigkeiten 44
5.4.2 Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern 45
5.4.3 Rezidivauftreten und Überleben 45

5.4.4 Univariate und multivariate Analyse 47
6 DISKUSSION 48
6.1 Methode 48
6.1.1 Asservation der Lymphknoten und Probenaufbereitung 48
6.1.2 RT-PCR-Methode 49
6.2 Ergebnisse 50
6.2.1 CK-20 m-RNA Detektion in peritumoralen Lymphknoten 50
6.2.2 CEA-m-RNA Detektion in peritumoralen Lymphknoten 51
6.2.3 Ck 20- und CEA-m-RNA Detektion in peritumoralen Lymphknoten53
6.3 Tumorbiologische Interpretation der CEA- und Ck 20-Detektion mit der RT-PCR in peritumoralen Lymphknoten 54
6.3.1 Prognostisch „falsch positive“ und „falsch negative“ Ergebnisse.. 54
6.3.2 Dormant cells 55
6.3.3 Illegitime Transkription 56
6.3.4 Kontamination 58
6.4 „Sentinel“-Lymphknoten Untersuchung 59
6.5 Prognostische Bedeutung 60
6.6 Ausblick 62
7 ZUSAMMENFASSUNG 64
8 LITERATURVERZEICHNIS 66
9 PUBLIKATION 72
10 ANHANG 73
10.1 Laborprotokoll 73
10.1.1 Färbemethoden 73
10.1.2 RNA – Extraktion 76
10.1.3 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts 77
10.1.4 RT – PCR 77
10.1.5 Elektrophorese der RT-PCR-Produkte 79
11 CURRICULUM VITAE 80
12 DANKSAGUNG 82
13 EHRENWORT 83

VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Seite

1 Einleitung

Abb. 1.1: Todesraten in den USA 1990/2000 7

2 Stand der Wissenschaft

Abb. 2.1: Grundprinzipien der MRD 13

Abb. 2.2: Mechanismus der RT-PCR 17

4 Patienten, Material und Methodik

Abb. 4.1: Sensitivitätsnachweis der CEA-Primer 26

Abb. 4.2: Sensitivitätsnachweis der Ck 20- Primer 27

Abb. 4.3: m-RNA Elektrophorese 32

Abb. 4.4: Gelelektrophorese der Ck 20-RT-PCR-Produkte 35

Abb. 4.5: Gelelektrophorese der CEA-RT-PCR-Produkte 35

Abb. 4.6: Gelelektrophorese der ß-MG-RT-PCR-Produkte 36

5 Ergebnisse

Tab. 5.1: Klinische Daten und CEA- / Ck 20-m-RNA Nachweis 38

Tab. 5.2: Korrelation der Ck20-Detektionsrate und Rezidivrate 40

Tab. 5.3: Multivariate Überlebensanalyse für die Ck 20-RT-PCR 41

Tab. 5.4: Korrelation CEA- Detektionsrate und Rezidivrate 42

Tab. 5.5: Multivariate Überlebensanalyse für die CEA-RT-PCR 44

Tab. 5.6: Korrelation Ck 20-/CEA-Detektionsrate und Rezidivrate 46

Tab. 5.7: Multivariate Überl.-analyse für Ck 20-/CEA-RT-PCR 47

Abb. 5.1: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Ck 20-RT-PCR 40

Abb. 5.2: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für CEA-RT-PCR 43

Abb. 5.3: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Ck 20-/CEA-RT-PCR 46

ABKÜRZUNGEN

annealing	Primerbindung am RNA-Strang
APAAP	alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase
beads	antikörpergekoppelte Markerelemente
ß-MG	ß-Mikroglobulin
CEA	Carcino-embryanales Antigen
Ck 20	Cytokeratin 20
cDNA	copy DNA
DTC	disseminierte Tumorzellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten stimulierender Faktor
H.E.-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
IHC	Immunhistochemie
I.H.	Immunhistochemie
ITC	isolierte Tumorzellen
i(-)	immunhistochemisch tumorzellfreier Lymphknoten
i(+)	immunhistochemisch tumorzellbefallener Lymphknoten
5-JÜLR	5-Jahres-Überlebensrate
KRK	kolorektales Karzinom
MAK 17-1A	monoklonaler Antikörper 17-1A
MNZ =MNC	Mononukleäre Zellen
MRD	minimal residual disease
mol(-)	molekularbiologisch tumorzellfreier Lymphknoten
mol(+)	molekularbiologisch tumorzellbefallener Lymphknoten
m-RNA	messenger-Ribonukleinsäure
ns	nicht signifikant
o.g.	oben genannt
PCR	polymerase chain reaction= Polymerase-Kettenreaktion
Ptn.	Patienten
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse-transcriptase-polymerase chain reaction

RT	reverse Transkriptase
SN	sentinel Lymphknoten
total-RNA	gesamte Ribonukleinsäure
TUZ	Tumorzellen
u.a.	unter anderem
V.a.	Verdacht auf

1 EINLEITUNG

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie

Das kolorektale Karzinom gehört weltweit zu den häufigsten Tumorerkrankungen und weist trotz moderner Präventionsmaßnahmen eine steigende **Inzidenz** auf (20-30 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner). Es steht für beide Geschlechter an dritter Stelle aller krebsbedingten Todesfälle (s. Abb. 1.1), bei Frauen ist es das zweithäufigste und bei Männern das dritthäufigste Malignom[10, S.216].

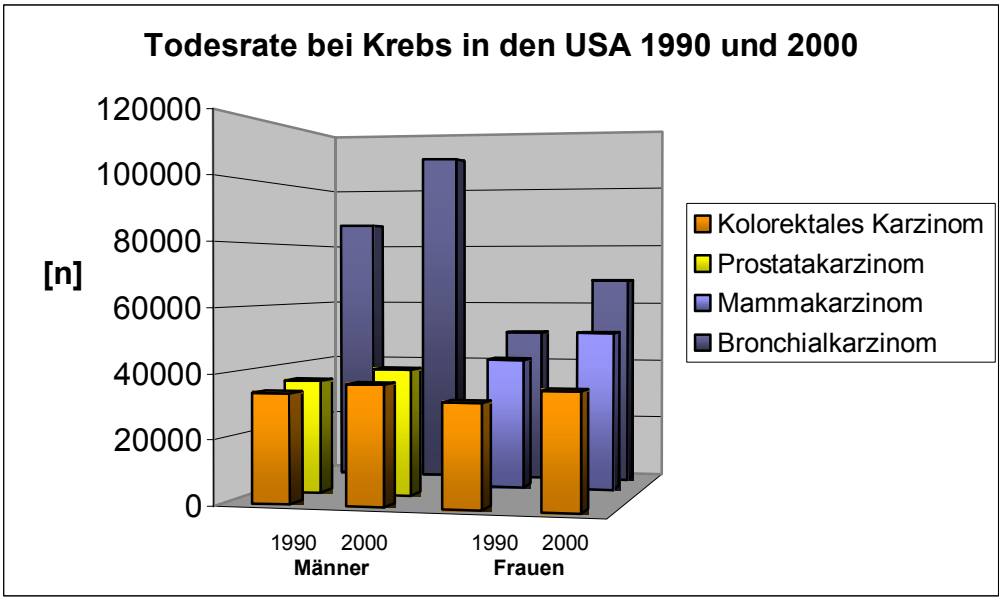

Abb. 1: Todesrate bei Krebs in den USA 1990 und 2000[4,S.1749]

Es wird angenommen, dass ca. 90% der kolorektalen Karzinome sporadisch auftreten und sich aus Adenomen bilden, die präkanzeröse Veränderungen darstellen (Adenom-Karzinom-Sequenz). Über die **Entstehungsursache** existieren zahlreiche nicht gesicherte Hypothesen. In immerhin 10% der Fälle sind hereditäre Erkrankungen als Präkanzerosen mit unterschiedlicher

Dominanz die Ursache[46,S.731]. Multizentrizität durch synchrone kolorektale Zweitkarzinome wird in 2-3% der Fälle beschrieben[10, S.217].

Die Entstehung kolorektaler Karzinome bleibt oft aufgrund des schleichenden Beschwerdebeginns mit unspezifischen **Symptomen** wie paradoxer Diarrhö lange Zeit unbemerkt. Späte Hinweise sind die oft fehlgedeuteten Blut- und Schleimbeimengungen im Stuhl, Tenesmen sowie Stenosebeschwerden mit „Bleistiftstuhl“ und unwillkürlichem Stuhl- und Windabgang. Weitere Komplikationen in fortgeschrittenen Stadien sind Gewichtsabnahme, Meläna mit konsekutiver Anämie, Darmobstruktion mit resultierendem Ileus, Perforation mit Abszessbildung und Tumorzellimplantation in die Bauchhöhle bei Serosadurchbruch sowie Infiltration von Nachbarorganen[46, S. 734].

Der **Früherkennung** und damit der sekundären Prävention dieses Malignoms dient neben Anamnese und allgemeiner klinischer Untersuchung der Hämokkult-Test, der ab dem 40. Lebensjahr jährlich durchgeführt werden sollte. Im Rahmen der von der Burda-Stiftung geförderten Früherkennung wird in Deutschland die regelmäßige Koloskopie ab dem 40. Lebensjahr propagiert, die von den Krankenkassen ab dem 50. Lebensjahr bezahlt wird. Zur **Diagnosesicherung** wird die Koloskopie mit Probeexzision in Kombination mit bildgebenden Verfahren wie Kolonkontrasteinlauf und in naher Zukunft möglicherweise auch die virtuelle MRT-/CT-Koloskopie eingesetzt. Das präoperative **Tumorstaging** beinhaltet die Abdomen-Sonographie und ggf. ein Abdomen-CT, Röntgen-Thorax sowie der CEA-Serumlevel, beim Rektumkarzinom die Endosonographie des Rektums und das MRT des Beckens.

Im Rahmen des **postoperativen Stagings** werden die kolorektalen Karzinome nach der TNM-Klassifizierung der Unité Internationale Contre le Cancer (UICC) (Stadium I-IV), sowie in Differenzierungsstufen (Grading G_{1-4}) eingeteilt. Die R-Klassifizierung (R_{0-2}) macht Aussagen über den Residual-status nach erfolgter Operation. Weiterhin bestehen verschiedene histopathologische Subtypen wie tubulopapilläre oder muzinöse

Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome oder Sonderformen wie zum Beispiel Siegelringzellkarzinome oder Gallertkarzinome. Zudem kommen auch verschiedene makroskopische Wachstumsformen (diffus infiltrierend, polypös ulzerierend) vor.[46, S.734]

Die **Metastasierung** erfolgt beim kolorektalen Karzinom zuerst lymphogen in regionäre, bzw. parakolische Lymphknoten, später in die zentralen und paraaortalen Lymphknoten, sowie hämatogen entsprechend dem portalvenösen Blutstrom vor allem in Leber und Lunge. Die Wahrscheinlichkeit der syn- oder metachronen Fernmetastasierung nimmt dabei beim kolorektalem Karzinom mit zunehmender TN-Kategorie und abnehmender Differenzierung zu[10, S.218][37, S.339].

Bei gegebener Operabilität und Resektabilität erfolgt gemäß der Prinzipien der onkologischen Chirurgie die **Operation** nach standardisierten Resektionsformen. Postoperativ schließt sich die histopathologische Diagnostik an. Das angestrebte Ziel ist dabei die kurative Tumorresektion mit vollständiger Tumorentfernung (R_0) und radikaler Lymphadenektomie, die durch adjuvante Chemotherapie oder beim Rektumkarzinom auch durch neoadjuvante Radio-/Chemotherapie ergänzt werden kann.

1.1.2 Prognosefaktoren

Entsprechend der Empfehlungen des College of American Pathologists werden die Prognosefaktoren beim kolorektalen Karzinom in vier **Kategorien** eingeteilt [5, S. 979]:

Die **Kategorie I** beinhaltet die in der TNM-Klassifikation der UICC gesicherten Prognosefaktoren Tumorausdehnung (pT), nodaler Status (pN) und Vorhandensein von Fernmetastasen (pM). Daneben gelten Angioinvasion,

Lymphangiosis carcinomatosa sowie der Residualstatus (R) und der präoperative Serum-CEA-Level als gesicherte Faktoren.

Die **Kategorie IIA** umfasst gut untersuchte aber noch nicht gesicherte unabhängige Prognosefaktoren wie Grading, Tumorfreiheit des radialen Resektionsrandes sowie R-Status des Resektats nach neoadjuvanter Therapie (=ypTNM).

Der **Kategorie II B** werden Parameter zugeteilt, die bisher vielversprechende Ergebnisse geliefert haben, aber wegen fehlender Daten nicht zu II A gezählt werden können. Dies sind histologischer Typ, Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-H), Heterozygotizitätsverlust und Wachstumstyp.

Die **Kategorie III** beinhaltet Faktoren, die bezüglich ihrer prognostischen Relevanz noch nicht ausreichend untersucht sind. Unter anderem sind dies Parameter wie DNA-Ploidie, Alteration anderer molekulargenetischer Marker wie p53 oder DCC, perineurale Invasion, Tumorangiogenese und Mikrogefäß-Dichte, spezifische Zellproteine wie **Cytokeratin 20**, peritumorale Fibrose und inflammatorische Begleitreaktion.

Weitere gut untersuchte Faktoren wie beispielsweise die Tumorgrösse und die Tumorkonfiguration weisen keinen prognostischen Wert auf und zählen zur **Kategorie IV**.

Nach residualtumorfreier Resektion (**R_0**) gilt vor allem der **Lymphknoten-Status (pN)** als prognosebestimmend. Dies spiegelt sich in den Daten für die 5-Jahres-Überlebensrate unserer Klinik wider: 98% im TNM-Stadium I, 85% im TNM-Stadium II, und nur 57% im TNM-Stadium III mit bestehenden Lymphknotenmetastasen (pN_+)[44, S.385][37, S.351].

Ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein **disseminierter Tumorzellen** in Lymphknoten beim kolorektalen Karzinom und einer schlechteren Prognose konnte in einigen bisherigen Studien aufgezeigt

werden[41,S.1242][10,S.217][30,S.385][14,S.39]. Die Thesen über eine mögliche prognostische Relevanz stützen sich darauf, dass ca. 25% der Patienten mit R_0-reseziertem kolorektalen Karzinom im UICC-Stadium I oder II (d.h. ohne Lymphknoten-Metastasen) am Tumorrezidiv sterben.

Bisher ist jedoch die Detektion isolierter Tumorzellen im Sinne einer **„minimal residual disease“** (s. Kap. 2.1) weder als etablierter Prognosefaktor anerkannt, noch hat sie zu therapeutischen Konsequenzen geführt.

2 STAND DER WISSENSCHAFT

2.1 Minimal residual disease (=MRD)

2.1.1 Definition und Kompartimente

Im Rahmen der frühen Metastasierung von Tumoren lösen sich einzelne Tumorzellen aus dem Zellverband und gelangen nach Invasion von Lymphbahnen oder Blutgefäßen in andere **Kompartimente** (s. Abb. 2.1). Das Vorhandensein dieser malignen Zellen in Lymphknoten, Knochenmark, peripherem Blut und Körperhöhlen wird als „minimal residuale Tumorerkrankung“ (=minimal residual disease) bezeichnet.

Definitionsgemäß finden sich einzelne oder mehrere **„disseminierte Tumorzellen“** (ohne umgebende Stromareaktion) oder **„Mikrometastasen“** (=Tumorzell-Cluster mit Durchmesser <2mm und Stromareaktion), zwischen denen genauer differenziert werden muss, um durch eine einheitliche Nomenklatur[21,S.2772] den Vergleich bisheriger Studien und der Angaben zur Inzidenz möglich zu machen.

Um den Prognoseparameter „Mikrometastasierung“ und „isolierte Tumorzellen“ (=ITC) zukünftig ggf. berücksichtigen zu können, ist die Bezeichnung **„mi“** für Mikrometastasen und **„i“** für isolierte Tumorzellen optional in die UICC-Klassifikation aufgenommen worden[53]. Ebenso gibt es Vorschläge, die verwendete Untersuchungsmethode zu beschreiben: Lymphknoten sollen mit **pN_0(i+) / (i-)** bzw. **pN_0(mol+) / (mol-)** für immunhistochemisch bzw. molekularbiologisch positiv oder negativ bezeichnet werden[21,S.2670], wenngleich daraus derzeit noch keine Therapieempfehlung für Patienten mit MRD abgeleitet wird.

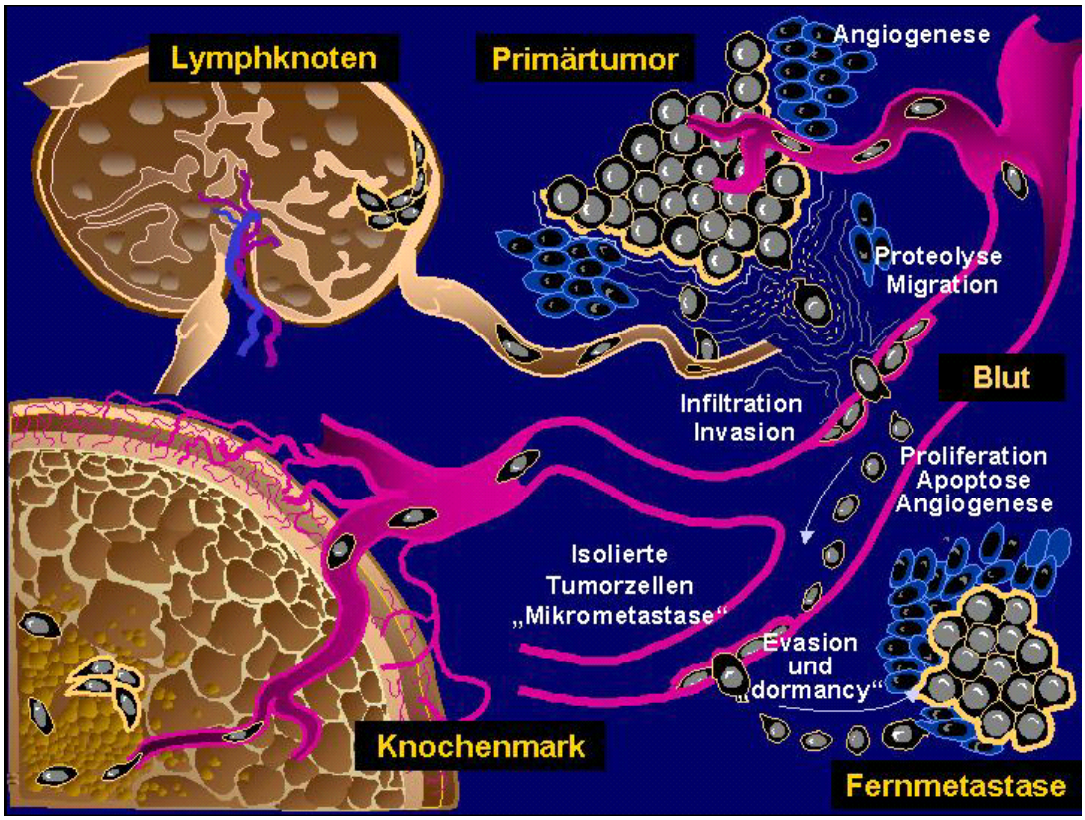

Abb. 2.1: Grundprinzipien der lokalen Tumorprogression und Metastasierung im Sinne einer „minimal residualen Tumorkrankheit“ [38,S.14]

2.1.2 Bedeutung der MRD

Mehr als 20 % der Patienten mit kolorektalem Karzinom im UICC-Stadium I / II ohne konventionellen histopathologischen Nachweis von Tumorzellen in Lymphknoten entwickeln nach scheinbar kurativer Resektion (R_0N_0) ein **Rezidiv**[50,S.639], woran 20-30% dieser Patienten bei einer **5-Jahres-Überlebensrate** von 54%-85% versterben[9,S.99][27,S.223]. Daher scheint die Einteilung der kolorektalen Karzinome nach den UICC-Stadien zur Indikation einer adjuvanten Therapie hinsichtlich des prädiktiven Wertes für die UICC-Kategorie II nicht ausreichend zu sein. Jedes Stadium enthält Patienten-Untergruppen mit unterschiedlichen **Prognosen**.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass schon zum Zeitpunkt der Operation bei einem Teil der „pN_0“-Patienten durch eine frühzeitige Tumorzellausbreitung in den o.g. Kompartimenten disseminierte Tumorzellen oder Mikrometastasen vorhanden sind, oder sich während der Operation ausbreiten. Sie können als zirkulierende oder als ortständige Zellen oder Zellverbände vorliegen.

Da diese Zellen mit den bisher eingesetzten Routinemethoden nicht entdeckt werden, resultiert durch diese okkulte Mikrometastasierung im Sinne einer MRD möglicherweise ein **Understaging** dieser Patienten, die von einer adjuvanten Therapie profitieren würden[45,S.1033].

Durch den Einsatz neuer Methoden wie beispielsweise der RNA-abhängigen RT-PCR zur Detektion tumorspezifischer Marker könnte es möglich werden, die Tumorausbreitung in andere Gewebe bereits auf dem Level einer einzigen Zelle zu erkennen [28,S.5]. Durch dieses **molekulare „super“-Staging** würde die Genauigkeit der Prognose, die signifikant vom Lymphknotenstatus abhängig ist, erhöht werden[29,S.223][30,S.389].

2.2 Detektionsmethoden

2.2.1 Verschiedene Methoden

Zur Detektion von Tumorzellen im Rahmen der „minimal residual disease“ in Lymphknoten, Blut oder Knochenmark werden verschiedene Methoden (s.u.) eingesetzt. Bisher konnte sich keine dieser Techniken als Routineuntersuchung im klinischen Alltag etablieren, weil entweder ihre Sensitivität bzw. Spezifität zu gering war, oder weil ihre Durchführung zu zeitaufwendig oder zu kostspielig ist.

Zur Identifikation vereinzelter Tumorzellen (MRD) wurden mikroskopische Serienschnitt-Analysen von **histologischen** Lymphknoten-Präparaten nach H.E.-Färbung durchgeführt. Andere Techniken, die jedoch keinen Vorteil

erbrachten, sind die Fett-Clearance [3,S.59] sowie die Anfertigung multipler Serienschnitte jedes Lymphknotens. Zur automatischen Detektion von gefärbten histologischen oder zytologischen Präparate wurden zur Arbeitserleichterung Scanner entwickelt, deren Sensitivität aber zu gering war [56,S.689][7,S.969].

Untersuchungen mit **immunhistologischen** bzw. **immunzytologischen Färbungen** mit Antikörpern gegen CEA, Pancytokeratin-Antikörper AE1/AE3, Ber-Ep4, CAM 5.2, u.a.[6,S.917][2,S.197][36,S.858] sind zwar relativ spezifisch, doch besteht ihr Nachteil einerseits im enormen Zeitaufwand und andererseits darin, dass auch von Phagozyten aufgenommenes antigenes Material zerfallener Tumorzellen angefärbt werden kann, oder dass die Antigenexpression in nicht-Tumorzellen („illegitime Transkription“) zu falsch positiven Ergebnissen führt. Der Vorteil ist, dass durch diese Methoden Tumorzellen lokalisierbar sind und eine ggf. vorhandene Stromareaktion identifizierbar ist. Die Sensitivität immunhistochemischer Methoden liegt bei 1 Tumorzelle in 10^{5-6} mononukleären Zellen[40,S.69], jedoch variieren die Prozentangaben der immunhistologisch positiven Lymphknoten zwischen den verschiedenen Studien stark, so dass diese Techniken standardisiert werden müssen, um die Ergebnisse vergleichbar und reproduzierbar zu machen.

Immunzytochemische **Doppelfärbeanalysen** zur Identifikation von wirklichen Tumorzellen werden mit Antikörpern gegen Cytokeratin und einem weiteren tumorspezifischen Marker (p53, ki-ras, PSA, erbB2-Onkogen, u.a.) durchgeführt, wobei auch Antikörper-Cocktails Verwendung finden[41,S.1246].

Zur Einzellzellanalyse tumorspezifischer genetischer Veränderungen nach Mikrodissektion dienen bei verschiedenen Tumorentitäten folgenden Methoden: die **FISH** (=Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)[41,S.1246], der **Northern blot**, die **Elektrochemilumineszenz-Detektion**[1,S.1128] und die auch beim kolorektalen Karzinom erprobte, aber inadäquate **MASA** (=mutant-allele-specific-amplification-methode)[18,S.369]. Eine weitere Methode auf genomischer Ebene ist die DNA-abhängige **PCR** zum Nachweis tumorspezifischer

genomischer Veränderungen (z.B. p53-Gen oder k-ras-Gen). Ihre hohe Heterogenität aufgrund des großen Anteils an Mutationen erfordert aber die Untersuchung des Primarius. Ebenso wurde die Untersuchung auf **Mikrosatelliten-Alteration** getestet[42,S.1117].

2.2.2 RT-PCR und Primer

Die RT-PCR (=**reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**) ist eine molekularbiologische Technik zur Detektion von m-RNA-Transkriptionsfragmenten.

Hierzu wird die aus den lysierten Gewebeproben extrahierte und gereinigte Gesamt-RNA (=total-RNA) **revers transkribiert** (3'→ 5'), wodurch cDNA-Stränge gebildet werden. An spezifischen, durch die Basensequenz definierten Stellen auf der cDNA binden **Oligonucleotid-Primer**, die einem komplementären DNA-Strangabschnitt von ca. 20-30 Basen entsprechen. Das Enzym **DNA-Polymerase** liest den cDNA-Strang in 3'→ 5'-Richtung und polymerisiert einen neuen cDNA-Strang in 5'→ 3'-Richtung, der in weiteren zyklischen Schritten wieder als Matrize dient, so dass es zu einer exponentiellen Zunahme des cDNA-Gehaltes kommt (s. Abb. 2.2). Die Darstellung der gebildeten cDNA-Stränge erfolgt durch elektrophoretische Auftrennung, die Bestimmung ihrer Konzentration durch photometrische Vermessung.

Da mit der RT-PCR als Ausgansmaterial **mutationsfreie Wildtyp-m-RNA** nachgewiesen wird, die in der Zelle als vielfache Kopie der genomischen DNA vorliegt, ist im Gegensatz zu DNA-abhängigen Methoden (z.B. Nachweis des p53-Gens oder Ki-ras-Onkogens) dabei die genomische **Heterogenität** durch tumorspezifische Mutationen, wegen der die Untersuchung der einzelnen Primärtumore notwendig wäre, bedeutungslos.

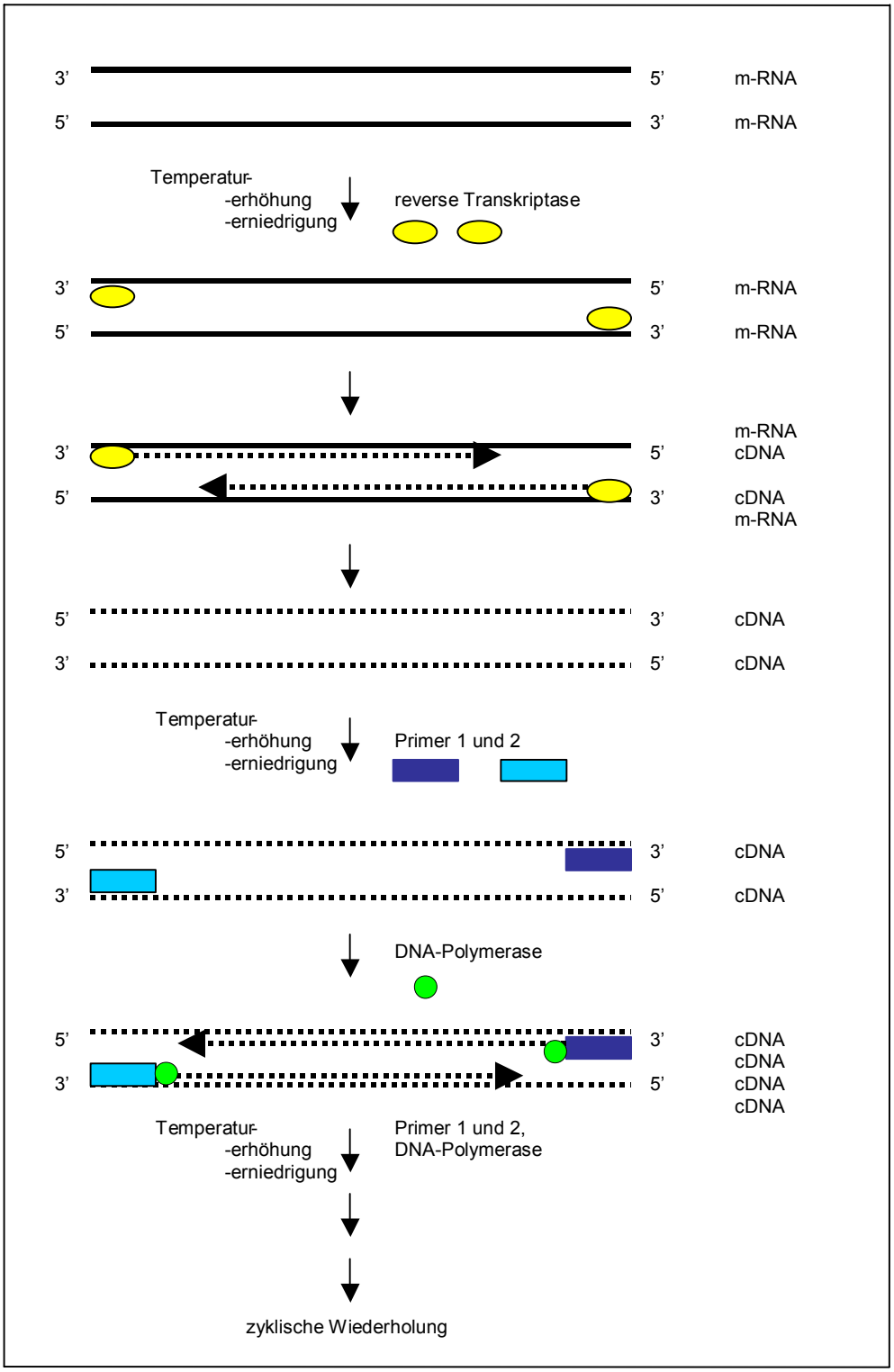

Abb. 2.2: Mechanismus der reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Tumorspezifische Marker für kolorektale Karzinome sind bisher noch nicht entwickelt worden. Zu den derzeit gebräuchlichsten gehören Primer für CEA, Matrilysin, CD 44 und Guanylyl-Cyclase C, Ck 19 und Ck 20, wobei letzterer die größte Spezifität für kolorektale Karzinome aufweist [14,S.34].

Das **karzinoembryonale Antigen (CEA)** ist eines der am häufigsten eingesetzten Targets für die Tumorzell-Detektion mittels RT-PCR[44,S.1419]. Trotzdem wurden speziell zur Detektion von Tumorzell-m-RNA in Lymphknoten beim kolorektalen Karzinom bisher nur wenige Studien mit der CEA-spezifischen RT-PCR gemacht. Dabei wurde nur in einer Studie mit einer kleinen Anzahl von Patienten eine verwertbare klinische Korrelation zwischen positivem Test und der Prognose beschrieben[29,S.223], so dass bis dahin die klinische Signifikanz immer noch unklar war.

CEA ist ein onkofetales Antigen, dessen normale Expression auf das fetale Kolon beschränkt ist, aber von normaler Schleimhaut und neoplastischem Gewebe des Gastrointestinaltraktes wieder exprimiert wird. CEA-m-RNA kommt daher in fast allen gastrointestinalen Tumoren vor, aber auch in nicht-epithelialen Zellen innerhalb von Lymphknoten, was zu falsch positiven Ergebnissen führen kann[30,S.387]. Außerdem ist die CEA-Amplifizierungsrate nicht in allen Geweben gleich hoch. Die Nachweisgrenze beim kolorektalen Karzinom liegt bei 10^2 Tumorzellen/10^7 mononukleäre Zellen, bei z. B. Ösophagus- und Magen-Karzinomen bei $10^3/10^7$ [34,S.3419].

Weitere eingesetzte Marker sind **Cytokeratine** zur Identifikation epithelialer Zellen. Dies sind verschiedene Intermediärfilamente, deren Expression eng mit spezifischen Differenzierungsprogrammen verbunden ist und jeweils durch ein einziges Gen kodiert wird[49,S.119]. Dabei konzentrierten sich die Untersuchungen auf den Einsatz von Cytokeratin-20 (Ck 20), mit dem beim kolorektalen Karzinom bessere Ergebnisse erzielt werden können als mit anderen Cytokeratinen.

Cytokeratin 20 kommt im Epithel des Gastrointestinaltraktes, im Urothel und in Merkel-Zellen vor und wird in fast allen kolorektalen Karzinomen und deren Metastasen in großen Mengen gebildet[32,S.427]. Für diesen Marker ist im Gegensatz zu Ck 18 und Ck 19 kein Pseudogen bekannt, womit eine wichtige Ursache für falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden kann[49,S.119] [17,S.612]. Ck 20 wird auch von wenig differenzierten oder anaplastischen Karzinomen noch exprimiert, lediglich $G_{3/4}$-Karzinome (solides bzw. Siegelringzell-Karzinom) zeigten bei Moll et al., 1992[32,S.435] negative Ergebnisse in der RT-PCR, so dass hier insgesamt 93% der Adenokarzinome des Kolorektums Ck 20 exprimierten.

Die **Kombination verschiedener Primer** kann ebenfalls dazu nutzen, die klinische Brauchbarkeit der Analysen zu verbessern. Von Futamura et al., 1998[14,S.35] ist auch die **nested-RT-PCR** für CEA und Ck 20 beschrieben worden, und wurde von uns während der Etablierung der Methode für CEA erprobt; eine größere Akkuranz konnte dadurch aber nicht erreicht werden. Das Prinzip dieser Technik besteht darin, eine erste RT-PCR durchzuführen, deren cDNA-Produkt eine Basensequenz enthält, an die ein anderer zweiter Primer bindet und dann die Transkription eines noch spezifischeren cDNA-Strangs einleitet.

Weitere RT-PCR-basierte Techniken wie die von Bilchik et al., 2001[1,S.1128] durchgeführte **multimarker-RT-PCR** zeigen, dass damit Tumorzellen in Lymphknoten gefunden werden können, die in der Routinehistologie als negativ eingestuft werden. Außerdem kann durch die Möglichkeit der **Quantifizierung** mit der real-time-fluorescence-RT-PCR die Reliabilität der RT-PCR-Technik erhöht werden[31,S.289].

2.3 Therapieformen der MRD

Die bisher praktizierte **adjuvante Chemotherapie** auf 5-FU-Basis bewirkt bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eine relative Reduktion der Letalität von ca. 30%[33,S.3]. Als Ursache für die eingeschränkte Effektivität dieser antiproliferativen Chemotherapie wird die verminderte oder aufgehobene proliferative Aktivität der mikrometastatischen bzw. disseminierten Tumorzellen diskutiert [25,S.1295] (s. Kap 6.3.2).

Daher gewinnen Therapieformen gegen **nicht-proliferierende** G_0-Phase Zellen an besonderem Interesse für die adjuvante perioperative Therapie. Sie könnten prophylaktisch gegen die Implantation ausgeschwemmter Tumorzellen wirken und so der Prävention manifester Metastasen dienen.

In einer randomisierten Studie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium UICC III nach R_0-Resektion konnte 1997 die Wirksamkeit der Therapie mit dem **monoklonalen Antikörper MAK 17-1A** mit signifikanten Ergebnissen gezeigt werden[53,S.17]. Dieser Antikörper richtet sich gegen das auf allen kolorektalen Zellen unabhängig vom Proliferationszyklus relativ homogen exprimierte Adhäsionsmolekül 17-1A[41,S.1242], so dass mikrometastatische oder isolierte Tumorzellen damit ein geeignetes Ziel für die MAK 17-1A-Therapie wären.

Durch die **Kombination** von MAK17-1 A und GM-CSF konnten von Pantel et al., 1997 [40,S.1247] bereits in 2 von 20 Fällen mit metastasiertem kolorektalem Karzinom komplette Remissionen erreicht werden. Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Effektivität dieser Antikörper-Therapie evtl. durch **Interferon** zu steigern ist, von dem zukünftig statt der murinen eine gentechnisch hergestellte humanisierte Form eingesetzt wird. Auch die Kombination mit **5-FU** stellt sich als erfolgsversprechend heraus.

Weiterer Studien mit MAK17-1 A ergaben keine signifikanten Daten, so dass die Behandlungsversuche in Deutschland abgebrochen wurden. Derzeit finden

Studien über die Effektivität dieser Antikörpertherapie nur noch in den USA statt; die Ergebnisse sind noch abzuwarten.

Die Bedeutung **autologer Tumorvakzine** wird in Studien geprüft, weil aufgrund der Heterogenität der residualen Tumorzellen sowie deren Primärtumoren die vollständige Elimination aller disseminierten Zellen durch einen einzelnen Antikörper eher unwahrscheinlich ist. Durch Doppelfärbe-Analysen (CK und 17-1A) ließe sich für den einzelnen Patienten ein individuelles Antigenprofil erstellen, wodurch dann **Antikörpercocktails** für einen besseren Therapieeffekt einsetzbar wären[25,S.1297].

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Ziel dieser retrospektiven Studie war die Untersuchung der prognostischen Signifikanz der RT-PCR-basierten Detektion disseminierter Tumorzellen in konventionell histopathologisch tumorfreien peritumoralen Lymphknoten beim residualtumorfrei resezierten kolorektalen Karzinom (R_0) der
Stadien UICC I und II ($pT_{1-4}N_0M_0$). Hierzu etablierten wir die RT-PCR-Methode mit den Primern für Carcinoembryonales Antigen (CEA) und Cytokeratin 20 (Ck 20).

Spezielle Fragen waren:

1. Sensitivität und Spezifität der RT-PCR-Methode

2. die Detektionsraten von CEA- und Ck 20-m-RNA

3. die Korrelation der CEA-m-RNA- und Ck 20-m-RNA- Detektion mit etablierten histopathologischen und prognostischen Daten wie Rezidivhäufigkeit und Überlebenszeit der Patienten

4 MATERIAL UND METHODIK

4.1 Material

4.1.1 Patientenkollektiv

Die Patientengruppe dieser retrospektiven Studie ist ein Subkollektiv von **85 Patienten**, die in unserer Klinik zwischen 08/88 und 02/95 aufgrund kolorektaler Karzinome im **UICC-Stadium I oder II** operiert wurden. Das Durchschnittsalter der Patienten war 63 Jahre. Die Anzahl der Frauen betrug 42 (49%) und die der Männer 43 (51%) (s. Tab. 5.1).

Zu den **Einschlusskriterien**, um in die Studie aufgenommen zu werden, gehörte, dass bei den Patienten die vollständige Resektion des Tumors erfolgt war, die entnommenen Lymphknoten bei der histopathologischen Untersuchung frei von Tumorzellen waren und somit keine Lymphknoten-Metastasierung nachgewiesen werden konnte (**$T_{1\text{-}4}N_0M_0R_0$**). Außerdem musste ausreichend schockgefrorenes Tumor- und Lymphknotengewebe für die Untersuchungen zur Verfügung stehen und das Vorhandensein von CEA- und Ck 20-positiven Tumorzellen im Primärtumor immunhistologisch gesichert sein. Außerdem war bei keinem der Patienten einer neo-/adjuvanten Chemo- oder Radiotherapie durchgeführt worden und der Zugriff zu allen klinischen Daten (follow up) war möglich.

Ausschlusskriterien waren das „lost of follow up“ im ersten Jahr oder eine postoperative Letalität innerhalb der ersten 90 Tage.

57 (67%) Tumore waren Kolonkarzinome, 28 (33%) befanden sich im Rektum. Gemäß der **TNM-Klassifizierung** wurden 22 (26%) Tumore dem Stadium I (pT_1=7, pT_2=15) und 63 (74%) Tumore dem Stadium II (pT_3=55, pT_4=8) zugeordnet. Bezüglich des **Gradings** fand sich 1 (1%) gut differenziertes (G_1), 63 (74%) mäßig differenzierte (G_2) und 21 (25%) schlecht differenzierte (G_3) Karzinome. Eine Lymphangiosis carcinomatosa bzw.

Angioinvasion wurde bei 11 (13%) Patienten nachgewiesen. **Histologisch** konnten die Tumoren in 70 (82%) tubulopapilläre, 14 (16%) muzinöse und 1 (1%) nicht klassifizierbaren eingeteilt werden, der **makroskopische** Typ war in 42 (49%) Fällen polypös und in 43 (51%) Fällen ulzerös. Bezüglich des **Invasionstypus** gab es 50 (59%) expansiv wachsende, 34 (40%) intermediäre und 1 (1%) diffus infiltrierenden Tumor. Der präoperative **CEA-Level** war bei 64 (75%) Patienten <5 µg/l, bei 21 Patienten >5 µg/l.

Die durchgeführten **Operationen** waren 10 (12%) abdominoperineale Rektumamputationen, 18 (21%) (tiefe) anteriore Rektumresektionen, 11 (13%) Sigmaresektionen, 12 (14%) linksseitige Hemikolektomien und 33 (39%) rechtsseitige Hemikolektomien, sowie 1 (1%) Proktokolektomie. Bei allen Patienten wurde gemäß der onkologischen Empfehlungen eine radikale Lymphknotenresektion durchgeführt[48,S.158]. Dabei wurden mit dem Primärtumor durchschnittlich 25 Lymphknoten en bloc reseziert (range 6-72). Bei 3 (3%) Patienten wurden weniger als 12 Lymphknoten entfernt.

Bei einem medianen **Follow-up** von 86 Monaten (range 41-128 Monate) waren die Überlebensdaten sowie die Information über das Rezidivmuster von allen Patienten verfügbar. Die wahre **5-Jahres-Überlebensrate** für die 85 Patienten war 73% (62 von 85 Ptn.). 18 (21%) Patienten entwickelten innerhalb von 72 Monaten postoperativ ein Rezidiv und starben während des Nachbeobachtungszeitraums. Fernmetastasen hatten 11 (13%) Patienten (9x Lebermetastasen, 1x Lungenmetastasen, 1x Lungen- und Lebermetastasen), **Fernmetastasen** und ein **Lokalrezidiv** traten bei 5 (6%) Patienten auf (1x Leber, 2x Lunge, 1x Leber und Lunge, 1x Haut) und bei 2 (2%) Patienten fand sich nur ein Lokalrezidiv.

Von den 67 (79%) Patienten, die kein Tumorrezidiv entwickelten, starben während des Beobachtungszeitraums 10 (15%) an einer nicht-krebsbedingten Todesursache und wurden bei der statistischen Überlebensanalyse zensiert. Dies ergibt ein **Gesamtüberleben** von 57 (67%) von 85 Patienten.

Entsprechend den Entscheidungen in unserem multidisziplinären Tumor-board wurden die **18 Patienten mit einem Tumorrezidiv** operiert und / oder einer palliativen Chemotherapie zugeführt: Von den 11 Patienten mit **Fernmetastasen** erhielten 7 eine palliative Chemotherapie nach dem Ardalan-Schema (5-FU+Folinsäure). Bei einem Patient wurde eine Leberresektion mit postoperativer Chemotherapie durchgeführt und 3 Patienten wurden aufgrund einer fortgeschrittenen Tumorkachexie nur symptomatisch behandelt.

Bei 3 der 5 Patienten mit **Lokalrezidiv und Fernmetastasen** erfolgte die lokale Tumorresektion und eine postoperative Radiochemotherapie (50 Gray und 5-FU/Folinsäure). Bei einem Patienten wurde eine alleinige Radiochemotherapie durchgeführt, bei einem anderen nur eine rein symptomatische Behandlung. Von den beiden Patienten, bei denen nur ein **Lokalrezidiv** vorlag, unterzog sich ein Patient einer Radiochemotherapie, der andere wurde nur symptomatisch behandelt.

4.1.2 Follow-up

Unsere Patienten wurden in den ersten beiden Jahren im Abstand von 3 Monaten und im dritten bis fünften postoperativen Jahr einmal jährlich nach einem standardisierten **Protokoll** in unserer chirurgischen Tumorambulanz nachuntersucht. Neben Anamnese und körperlicher Untersuchung umfasst es Laborwerte (BSG, Blutbild, Leberwerte, CEA), Abdomen-Sonographie, Röntgen-Thorax, Koloskopie oder bei Anastomose im Rektum Rektoskopie mit Endosonographie und Biopsie, sowie die Computertomographie des Abdomen und beim Rektumkarzinom auch des kleinen Beckens.

Die mediane **Nachbeobachtungszeit** war 86 Monate mit einer Streuung von 41-128. Dabei konnten 6 der Patienten (7%) nach einer mindestens 41 Monate langen Nachbeobachtungszeit nicht mehr aufgefunden und somit nicht mehr nachgesorgt werden.

4.1.3 Kontrollkollektiv

Zur Bestätigung der fehlerfreien Durchführung einer jeden RT-PCR und zum Ausschluss einer eventuellen Kontamination der Ansätze am Arbeitsplatz wurden standardmäßig Positiv- und Negativkontrollen bei allen Reaktionen mitgeführt.

Als **Negativkontrollen** wurde RNA aus Lymphknoten von 14 Patienten verwendet, die wegen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung operiert wurden (Colitis ulcerosa, M. Crohn) und nicht zusätzlich an einem malignen Tumor erkrankt waren. Die RT-PCR-Ergebnisse dieser Lymphknoten blieben dabei für beide Marker immer negativ.

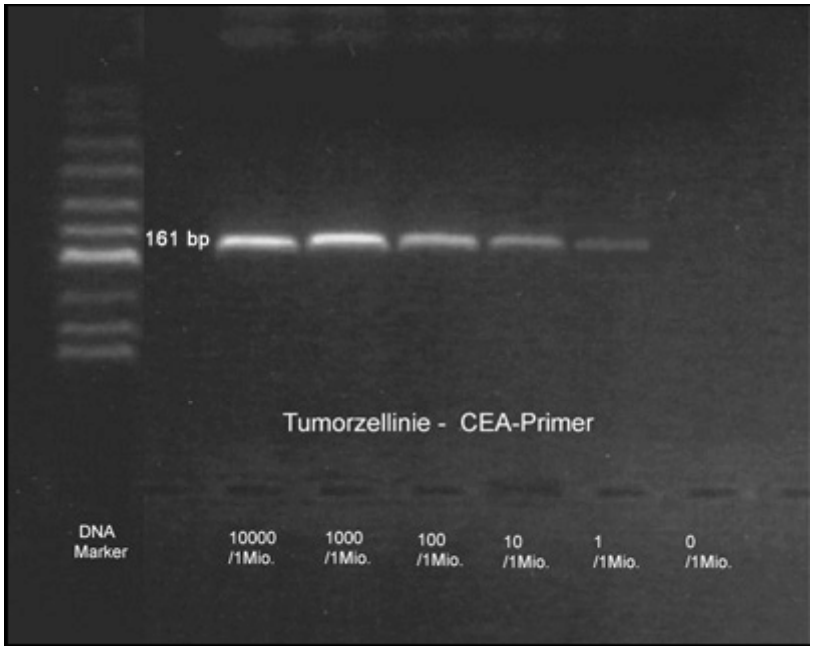

Abb 4.1: Sensitivitätsnachweis der CEA-Primer. Verdünnungsreihe der CaCo-20-Tumorzellinie in mononukleären Zellen (10^4-10^0TUZ/10^6 MNZ). Nachweisgrenze: 1TUZ/1Mio MNZ.

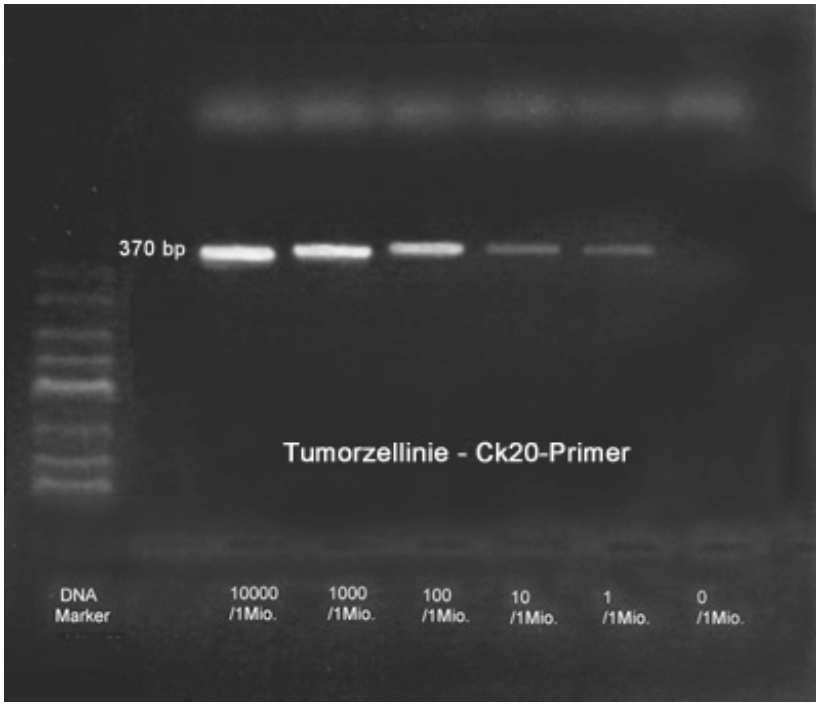

Abb 4.2: Sensitivitätsnachweis der Ck20-Primer. Verdünnungsreihe der CaCo-20-Tumorzellinie in mononukleären Zellen (10^4-10^0TUZ/10^6 MNZ). Nachweisgrenze: 1TUZ/1Mio MNZ.

Für die **Positivkontrollen** wurde gepoolte RNA aus 5 metastatisch befallenen Lymphknoten kolorektaler Karzinome und von 14 primären kolorektalen Karzinomen verwendet, mit der in der RT-PCR stark positive Signale für CEA und Ck 20 erzielt wurden. Außerdem wurden Tumorzellinien eingesetzt, die für beide Marker positiv sind. Dies waren die Linie CaCo-2 von kolorektalen Tumorzellen und MCF-7 aus einer Mammakarzinom-Zellinie, die in Kulturmedien (RPMI) bei 37°C in einer 4%igen CO_2-Atmosphäre gezüchtet wurden. Mit diesen Proben wiesen wir auch die **Spezifität** der Methode nach.

Die Tumorzellinien wurden zum Sensitivitätsnachweis der RT-PCR anhand von Verdünnungsreihen (s. Abb. 4.1 und Abb. 4.2) verwendet. Wir untersuchten die **Sensitivität** unserer RT-PCR mit Reihen von 10^6 bis 10^0 Tumorzellen pro10^6 mononukleären Zellen. 1 Tumorzelle/10^6 MNC konnte noch nachgewiesen werden.

Zur Bestätigung der fehlerfreien Amplifizierung wird für jede Probe eine RT-PCR mit Primern für **ß-Mikroglobulin** (ß-MG) durchgeführt, das von allen Zellen exprimiert wird.

4.2 Methodik

4.2.1 Lymphknotenasservation

Nach der Resektion des Tumors wurden innerhalb von 30 Minuten von einem erfahrenen Chirurgen aus dem en bloc resezierten Präparat Gewebeproben aus dem Tumor sowie **zwei peritumorale**, makroskopisch vergrößert erscheinende oder möglicherweise tumorbefallene Lymphknoten mit V.a. Lymphknotenmetastsen präpariert. Die Lymphknoten wurden in zwei Hälften geteilt, wovon eine sofort unfixiert in flüssigem Stickstoff bei –80°C **schockgefroren** und bis zur weiteren Verarbeitung gelagert wurde. Die andere Hälfte wurde für die histopathologische Routineuntersuchungen verwendet.

4.2.2 Kryomikrotomschnitte

Von allen 170 Lymphknoten wurden am Kryomikrotom 30 Schnitte á 15 µm für die RT-PCR angefertigt, und in gekühlten Kryo-Röhrchen bei –180°C aufbewahrt, falls später eine Probe nachbearbeitet werden musste (s. Kap. 4.2.5).

Von jedem Gewebeblock wurden vor und nach dieser Schnittserie für die histologische Beurteilung jeweils zwei Schnitte von 7 µm Dicke angefertigt und mit **Hämalaun-Eosin** (H.-E.) gefärbt, um zu bestätigen, dass anhand dieser Färbung keine Tumorzellen in diesen Lymphknoten nachweisbar sind und damit Material aus pN_0-Lymphknoten in die RT-PCR eingesetzt wurde.

Um eine Kontamination mit Tumorzell-RNA zwischen den einzelnen Lymphknoten-Blöcken zu vermeiden, wurden Einmalmaterialien verwendet und das Messer des Kryomikrotoms sowie die verwendeten Pinzetten nach Eintauchen in Ethanol abgeflammt.

4.2.3 Hämalaun-Eosin Färbung

Die luftgetrockneten Gefrierschnitte wurden 1-3 Minuten in 4%-igem Formalin fixiert, nach Spülen mit Aqua dest. 5 Minuten mit **Hämalaun** gefärbt und anschließend 5-10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut.

Danach erfolgte die Gegenfärbung mit **Eosin** (0,1%) für eine Minute, Spülen mit Aqua dest., Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%-96%-100%) und das Klären für 10 Minuten in Rotihistol (Xylolersatz). Dann wurden die Präparate mit Eukitt eingedeckt.

4.2.4 Immunhistologische APAAP-Färbung

Die **APAAP**-(=alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase)-Färbung ist eine immunhistologische Sandwich-Technik.

Die Fixierung der luftgetrockneten Kryostatschnitte der Primärtumoren erfolgte 30 Minuten in Aceton (Merck 14), danach 30 Minuten in Chloroform (Merck 2445). Danach beginnt die Färbung mit der Inkubation mit dem **primären Antikörper**, der spezifisch an die von den Tumorzellen exprimierten Zelloberflächenmoleküle bindet. Es wurden Antikörper gegen **CEA, Ck 20** und **Ep 4** verwendet, die zuvor in den Verhältnissen 1:5, 1:100 und 1:80 mit dem Zellkulturmedium RPMI gemischt wurden. Als Positivkontrolle wurde bei jeder Färbung ein bekanntermaßen positiv reagierender Tumorschnitt mitgeführt.

Mit jeweils 200 µl der spezifischen Antikörper wurden die Schnitte der einzelnen Serien beschichtet, die Negativkontrollen mit 200 µl PBS (Merck 295868) und 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit Spülpuffer gespült, 1 min in 4%igem Formalin fixiert und der Spülvorgang wiederholt.

Der **Brückenantikörper** rabbit-anti-mouse-Immunglobulin (Dako Z 259) wurde 1:20 mit RPMI-Medium verdünnt, dem zuvor im Verhältnis 1:8 inaktiviertes Humanserum (30 min bei 56 °C) zugesetzt wurde (pH 7,4 – 7,6). Es folgt die Inkubation mit 200 µl dieses zweiten Antikörpers wiederum für 30 Minuten und der Waschvorgang.

Für die Inkubation mit dem **dritten Antikörper**, dem **APAAP-Komplex**, wird dieser zuvor 1:160 mit RPMI-Medium verdünnt, dann wurden die Objektträger für 30 min inkubiert und danach wieder mit dem Spülpuffer gewaschen.

Die letzten beiden Inkubationschritte (Brückenantikörper und APAAP-Komplex; jeweils nur 10 min) wurden zur Sicherheit noch einmal wiederholt, bevor die Entwicklung durchgeführt wurde, für die der **Entwicklungspuffers** (EWP) direkt vor seiner Verwendung frisch hergestellt wird (Ansatz für 250 ml EWP siehe Anhang). Darin wurden die Objektträger weitere 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert, anschließend gespült, 5 Minuten mit Hämalaun (siehe HE-Färbung) gegengefärbt und gefärbt anschließend mit Spülpuffer gebläut, in dem die Präparate bis zum **Eindecken** mit Kaisers Glyceringelatine (Merck 9242) bleiben, um nicht auszutrocknen.

4.2.5 RNA Extraktion und Vermessung

Die Extraktion der Gesamt-(total-)-RNA jeder Probe und der Kontrollen wurde mit einem silika-gel-based Membransystem **RNeasy-Kit** (Quiagen) bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Vorbereitung des im Kit enthaltenen RLT-Puffer (+450 µl ß-Mercapto-Ethanol) und des RPE-Puffer (+44 ml

100%iges Ethanol) wurden die Zellmembranen mit 600 µl RLT-Puffer pro Probe lysiert.

Zum Trennen der Gewebepartikel von der m-RNA-haltigen Lösung wurde das gesamte Volumen bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert: zwei Minuten mit QIA-Shredder und weitere drei Minuten ohne diesen. Der Überstand wurde in einem neuen Eppendorff-Röhrchen mit 600 µl 70%iges Ethanol homogenisiert und die entstandene Lösung in zwei Schritten durch ein Filter zentrifugiert.

Die nun im Filter befindliche m-RNA wurde gewaschen und getrocknet: es folgten zwei **Waschvorgänge** mit Puffer (700 µl RW1-Puffer; 500 µl RPE-Puffer). Zum Trocknen der RNA und zur vollständigen Entfernung von Pufferresten folgte das zweiminütige Zentrifugieren 500 µl RPE-Puffer bei Höchstgeschwindigkeit. Zum Auswaschen der RNA wurde das Filter in einem sterilen Eppendorf-Röhrchen zweimalig mit 50 µl sterilem Wasser bei 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert.

Von jedem Lymphknoten wurde so ca. **40-60 µg Gesamt-(total-)RNA** gewonnen. Zur Überprüfung der RNA-Integrität und -Qualität wurden 2 µg der Proben auf einem 2%igem Agarose-Gel elektrophoretisch in die m-RNA sowie in die t- und r-RNA-Banden aufgetrennt (s. Abb. 4.3), sowie später in der RT-PCR mit den Primern für **ß-Mikroglobulin** auf ausreichende RNA-Amplifikation getestet. Bis dahin wurden die Proben bei –80°C aufbewahrt, falls eine Nachbearbeitung notwendig war (s. Kap. 4.2.2)

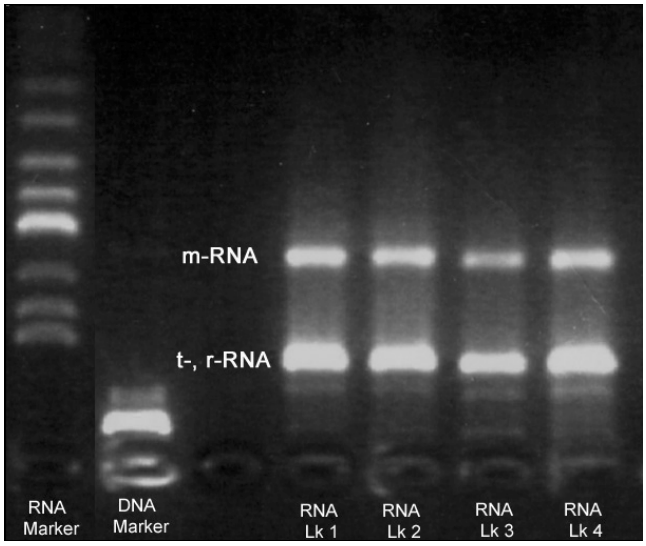

Abb.4.3: Elektrophoretische Auftrennung der m-RNA-, t-/r-RNA-Banden am Beispiel von 4 Lymphknoten-RNA-Extrakten. DNA ist nicht mehr enthalten.

4.2.6 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts

Der **RNA-Gehalt** und die Reinheit der RNA jeder einzelnen Probe wurde photometrisch bestimmt, um in der RT-PCR äquivalente Mengen der extrahierten total-RNA einsetzen zu können:

10 µl RNA wurden mit 990 µl DEPC-behandeltem Wasser (Diethylpyrocarbonat) bei den **Wellenlängen** λ_1= 260 nm und λ_2= 320 nm gegen DEPC-Wasser als Leerwert photometrisch vermessen. Der zu verwendende

Absorptionswert a ergab sich aus a = λ_1 - λ_2. Eine Absorption von a =1,000 entsprach dabei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Für die RT-PCR wurden jeweils 2,0 µg total-RNA eingesetzt. Der RNA-Gehalt pro extrahierte Probe errechnete sich wie folgt:

$40 \cdot a \cdot c = x$ µg RNA/ml mit c=100 (Verdünnung)

$40 \cdot a \cdot 100 \cdot 0{,}1 = x$ µg RNA/100 µl

$400\ a = x$ µg RNA/ Röhrchen

4.2.7 RT-PCR und Primer

Für die m-RNA-Detektion verwendeten wir die von Gerhard, 1994[14,S.726] veröffentlichten **CEA-Oligonukleotid-Primer**: Primer A1: 5´-TCT GGA ACT TCT CCT GGT CTC TCA GCT GG-3´, Primer A2: 5´-TGT AGC TGT TGC AAA TGC TTT AAG GAA GAA GC-3´ und die von Funaki, 1998[12,S.1327] beschriebenen **Primer für Ck 20**: Primer C1: 5`-CGT CTA ACA GTG GAA GCT GAT CTC-3´, Primer C2: 5`-TCG GGC GTT CCA TGT TAC TC-3`.

Es wurden das **Titan[tm]-One Tube RT-PCR-Kit** (Roche Diagnostics, Germany) verwendet. Je 2 µg der extrahierten total-RNA der Proben und der Kontrollen wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt, zuerst revers (in 3`-5`-Richtung) in cDNA transkribiert und anschließend amplifiziert.

Mit der Herstellung des Master-Mix I und II wurde begonnen: nach einem immer gleichen Protokoll wurden die einzelnen Substanzen in die PCR-Röhrchen pipettiert, und das primer-spezifische Programm am Landgraf Varius-V-Thermocycler (s. Kap. 10.1.4) gestartet:

Die **Reaktionsbedingungen** für die CEA-RT-PCR[14,S.726] waren folgende: Reverse Transkription bei 50°C für 30 min, Strangdenaturierung bei 94°C für 2 min, 10 Zyklen zur Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Annealing bei 69°C für 30 sec und Elongation bei 68°C für 45 sec, dann weitere 20 Zyklen unter den selben Bedingungen, gefolgt von einer Endrunde für die Elongation bei 68°C für 5 min.

Für die Ck 20-RT-PCR galten die folgenden Reaktionsbedingungen: RT bei 50°C für 30 min, Strangdenaturierung (=Auftrennung der DNA) bei 93°C für 5 min, 10 Zyklen zur Denaturierung (1 sec bei 94°C), Annealing (20 sec bei 63°C), Elongation (10 sec bei 72°C), 35 weitere Zyklen unter den gleichen

Bedingungen und einer Prolongation von 5 sec bei 72°C pro Zyklus und ein abschließender Elongationsschritt bei 72°C für 5 min.

Um die Intaktheit der extrahierten RNA nachzuweisen, wurde parallel zu den eingesetzten Primern für CEA und Ck 20 immer zuerst ein **Kontrollansatz** mit **ß-Mikroglobulin**-Primern (Primer M1: 5´-CCT GAA TTG CTA TGT GTC TGG GTT TCA-3´ und Primer M2: 5`- GGA GCA ACC TGC TCA GAT ACA TCA AAC-3`)[15, S.726] gemacht, um die Ansätze mit negativem Ergebnis wegen fehlerhaften Proben auszuschließen. Von diesen Lymphknoten wurden neue Proben angefertigt (s. Kap. 4.2.2). Die DNA-Amplifikation und die Verarbeitung des RT-PCR-Produkts erfolgte mit separaten Pipetten an getrennten, mit UV-Licht dekontaminiert Arbeitsplätzen, um Kontaminationen neuer Ansätze mit der hochkonzentrierten cDNA aus der RT-PCR zu vermeiden.

4.2.8 Ethidiumbromidgel-Elektrophorese

Von der in der RT-PCR amplifizierten cDNA wurden je 5 µl mit 2 µl Gel Loading Solution gemischt und auf einem 2%igen ethidiumbromidhaltigen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Bestimmung der gesuchten Banden wurde ein **DNA-Längenmarker** mit aufgetragen (DNA-Längenstandard VIII, Boehringer-Mannheim). Die Laufzeit betrug bei 100 Volt und 160 Milliampère ca. 2-3 Stunden (s. Abb. 4.4, 4.5 und 4.6).

4.2.9 Sequenzierung

Durch die außerhalb unseres Labors durchgeführte Sequenzierung der cDNA-Abschnitte für CEA und Ck 20 aus der RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Primer an die spezifische target-m-RNA gebunden hatten, und somit die entsprechenden spezifischen Abschnitte der m-RNA amplifiziert wurde.

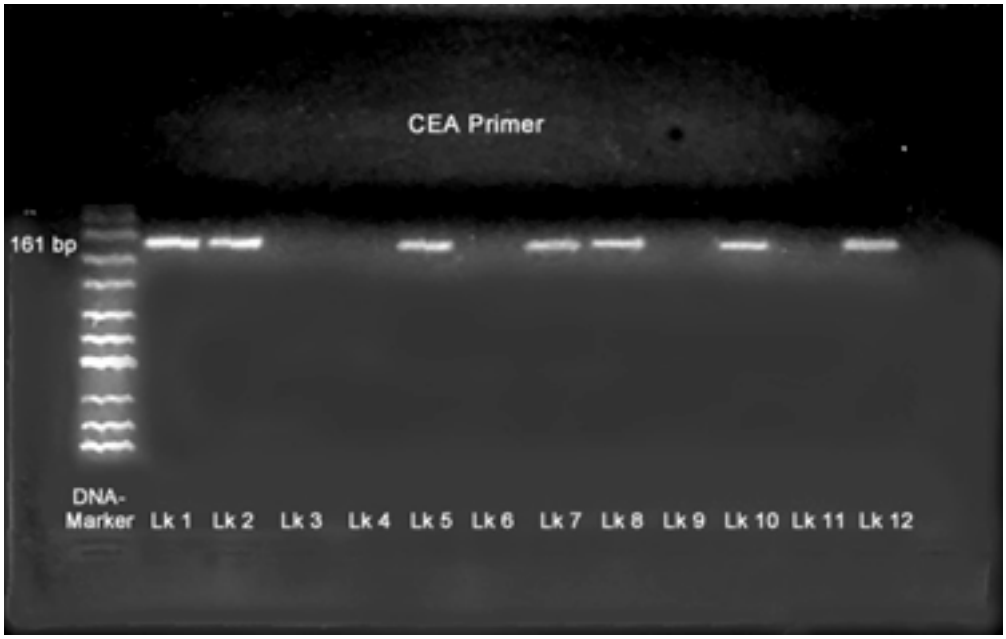

Abb 4.4: Elektrophoretische Darstellung der CEA-RT-PCR-Produkte (cDNA; 161 Basenpaare) am Beispiel von 12 Lymphknoten. Positiv gewertet wurden: Lk1, Lk2, Lk5, Lk7, Lk8, Lk10, Lk12)

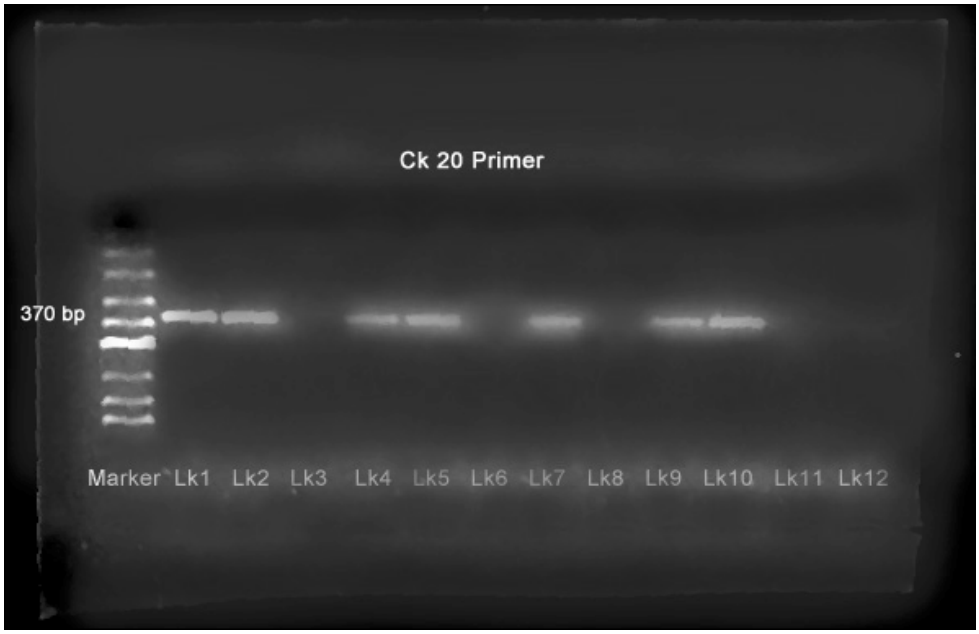

Abb 4.5: Elektrophoretische Darstellung der Ck20-RT-PCR-Produkte

(cDNA; 370 Basenpaare) am Beispiel von 12 Lymphknoten.
Positiv gewertet wurden: Lk1, Lk2, Lk4, Lk5, Lk7, Lk9, Lk10)

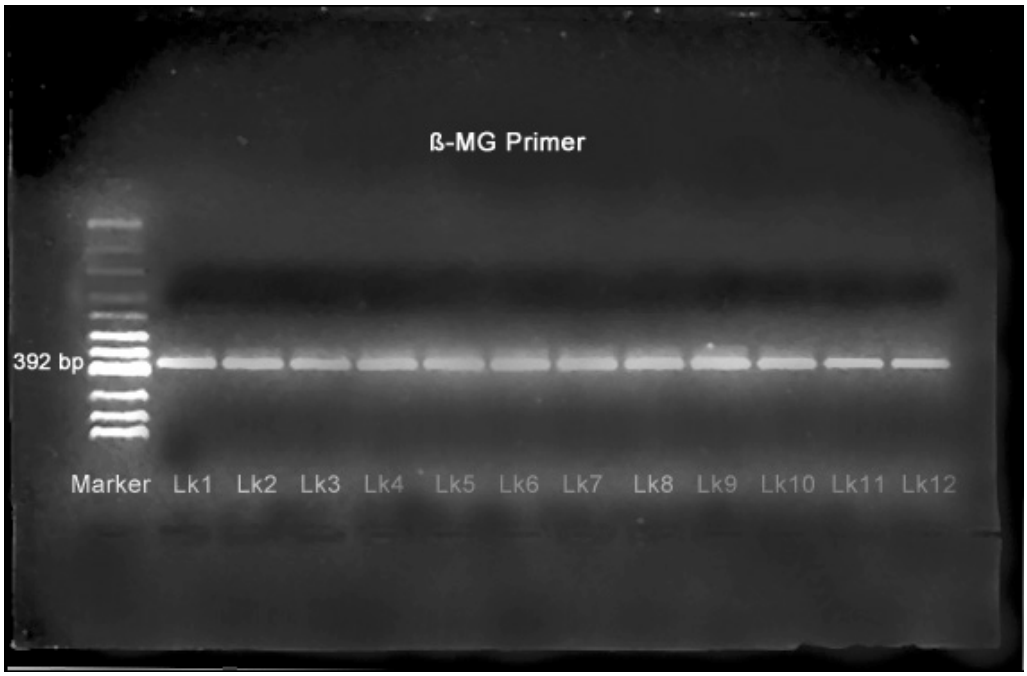

Abb 4.6: Elektrophoretische Darstellung der ß-MG-RT-PCR-Produkte (cDNA; 392 Basenpaare) am Beispiel von 12 Lymphknoten. Positiv gewertet wurden alle Lymphknoten (Lk1-Lk12)

4.3 Statistische Auswertung

Für den Vergleich der Gruppen wurde dabei der **chi-Quadrat-Test** benutzt. Die Unterschiede im Überleben zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des **log-rank-Tests** analysiert. Überlebens-Analysen und gruppenbezogene Überlebens-Kurven nach **Kaplan-Meier** wurden für die gesamte Patientengruppe (n=85) erstellt. Die **Cox-Regressions-Analyse** wurde für **multivariate Analysen** eingesetzt. Alle Tests waren zweiseitig, ein Unterschied von $p<0,05$ wurde als signifikant gewertet.

5 ERGEBNISSE

5.1 Sensitivität und Spezifität der Methode

Der **Sensitivitätsnachweis** erfolgte anhand von Verdünnungsreihen (10^6-10^0 TUZ / 10^6 MNC) der Tumorrzellinien CaCo-2 und MCF-7 (s. Abb. 4.1 und Abb. 4.2). Die Nachweisgrenze lag für die **Ck 20**-Primer[13,S,1327] und die **CEA-**Primer[15,S.726] bei 1 Tumorzelle in 1 Million mononukleären Zellen.

Die **Spezifität** prüften wir durch Analysen unspezifisch veränderter Lymphknoten von Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung im Vergleich zu gepooltem Primärtumorgewebe, histologisch kontrolliert tumorzellhaltigen Lymphknoten und Marker-positiven Tumorrzellinien.

5.2 Ck 20 RT-PCR

5.2.1 Detektionshäufigkeiten

Die **Ck 20-RT-PCR** in den peritumoralen Lymphknoten der 85 Patienten mit kolorektalem Karzinom im UICC-Stadium I / II war in **44** (52%) Fällen positiv. Ck 20 positive Lymphknoten traten häufiger bei Frauen (33%) als bei Männern (19%)($p>0,05$) und häufiger bei jüngeren als bei älteren Patienten ($p>0,05$) auf. Die Lokalisation des Primärtumors im Kolon oder im Rektum ergab keine signifikanten Unterschiede in der Detektionshäufigkeit für Ck 20 m-RNA (s. Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Korrelation klinischer und histopathologischer Faktoren mit dem CEA- bzw. Ck20-m-RNA-Nachweis in kolorektalen Lymphknoten mit RT-PCR (n= 85)

			CEA-RT-PCR					Ck20 RT-PCR					CEA und Ck20 RT-PCR				
			positiv (48%)		negativ (52%)			positiv (52%)		negativ (48%)			positiv (40%)		negativ (41%)		
Variable	n	%	n	%	n	%	p	n	%	n	%	p	n	%	n	%	p
Gesamt	85	100	41	48	44	52		44	52	41	48		34	40	35	41	
Geschlecht																	
männlich	43	51	24	28	19	22	ns	16	0	27	0	ns	15	0	24	0	ns
weiblich	42	49	17	20	25	29		28	0	14	0		20	0	11	0	
Tumor-lokalisation																	
Kolon	57	67	24	28	33	39	<0,003	27	32	30	35	<0,002	19	22	38	45	<0,003
Rektum	28	33	17	20	11	13		17	20	11	13		15	18	13	15	
Grading																	
gut	1	1	1	1	0	0	ns	0	0	1	1	ns	0	0	0	0	ns
mäßig	63	74	31	36	32	37		26	30	37	43		30	35	33	39	
schlecht	21	25	8	9	13	15		5	6	16	19		5	6	16	19	
pT Kategorie																	
pT 1	7	8	4	5	3	3	ns	2	2	5	6	ns	1	1	6	7	ns
pT 2	15	18	9	10	6	7		8	9	7	8		9	10	6	7	
pT 3	55	65	23	27	32	38		18	21	37	43		21	25	34	40	
pT 4	8	9	5	6	3	3		3	3	5	5		3	3	5	6	
UICC Stadium																	
I	22	26	13	15	9	10	<0,03	10	12	12	14	ns	11	13	11	13	<0,03
II	63	74	28	33	35	41		21	33	42	49		23	27	40	47	
Lymphangiosis carcinomatosa																	
ja	11	13	8	9	3	3	<0,05	5	6	6	7	ns	7	8	4	5	ns
nein	74	87	32	38	42	49		26	30	48	56		27	32	47	55	
CEA-Level																	
<5	64	75	35	41	34	40	ns	22	26	42	49	ns	29	34	40	47	ns
>5	21	25	6	7	10	12		9	10	14	57		5	6	11	13	

5.2.2 Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern

Bei 61% der Ck 20 positiven Patienten war der Tumor im Kolon lokalisiert und fand sich dort **signifikant** häufiger als im Rektum (p<0,002). Die Parameter Geschlecht, Alter, Grading, pT-Kategorie, UICC-Stadium, Lymphangiosis carcinomatosa und der präoperative Serum-CEA-Level zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ck 20 positiven und Ck 20 negativen Patienten (s. Tab. 5.1).

5.2.3 Rezidivauftreten und Überleben

Insgesamt entwickelten 18 (21%) der 85 Patienten ein **Rezidiv**, an dem sie innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes verstarben. Dabei wiesen 15 der 18 (83%) Patienten mit Tumorrezidiv eine **positive Ck 20-RT-PCR** auf, die anderen 3 (17%) der 18 Patienten hatten negative Ck 20-RT-PCR-Ergebnisse. Unter der Annahme, dass bei allen Patienten mit später aufgetretenem Rezidiv Tumorzellen in den Lymphknoten nachweisbar sind, gelten diese Patienten als „falsch negativ“ detektiert. 29 (66%) von 44 Patienten mit Ck 20-Expression blieben rezidivfrei, wobei 4 (9%) von ihnen tumorunabhängig verstorben waren. Von den 41 (48%) Patienten mit **negativer** Ck 20-RT-PCR starben 3 (7%) am Rezidiv und 6 (15%) nicht krebsbedingt. Am Ende des Nachsorgezeitraums lebten damit insgesamt noch 57 (67%) Patienten (s. Tab. 5.2).

Die Ck 20-Detektionsraten waren mit dem Anteil der **Rezidivfälle** in den jeweiligen Tumorstadien **korreliert**: 6 (40%) von 15 pT_2-Patienten entwickelten ein Rezidiv und verstarben, wohingegen nur 2 (28%) der 7 pT_1-Patienten und 7 (13%) der 55 pT_3- sowie 3 (38%) der 8 pT_4-Tumoren Rezidive entwickelten. Dies zeigt, dass die pT_2-Patienten ein erhöhtes Risiko für die Rezidiventwicklung haben.

Die **5-Jahres-Überlebensrate** für die Patienten mit positiver Ck 20-RT-PCR in den Lymphknoten war mit 77,9% +-6,5% signifikant schlechter als für diejenigen ohne Ck 20-Expression (94,7% +- 3,7%) ($p<0,009$) (s. Abb. 5.1).

Tab. 5.2: Korrelation der Ck20-Detektionsrate und der Rezidivrate

	Ck20 RT-PCR (+)	Ck20 RT-PCR (-)	gesamt
Rezidiv (+)	15 (34%)	3 (7%)	18 (21%)
kein Rezidiv (-)	29 (66%)	38 (93%)	67 (79%)
	44 (52%)	41 (48%)	n=85
R (-) und krebsunabh. verstorben	4 (9%)	6 (15%)	10 (12%)
R (-) und lebend	25 (29%)	32 (78%)	57 (67%)

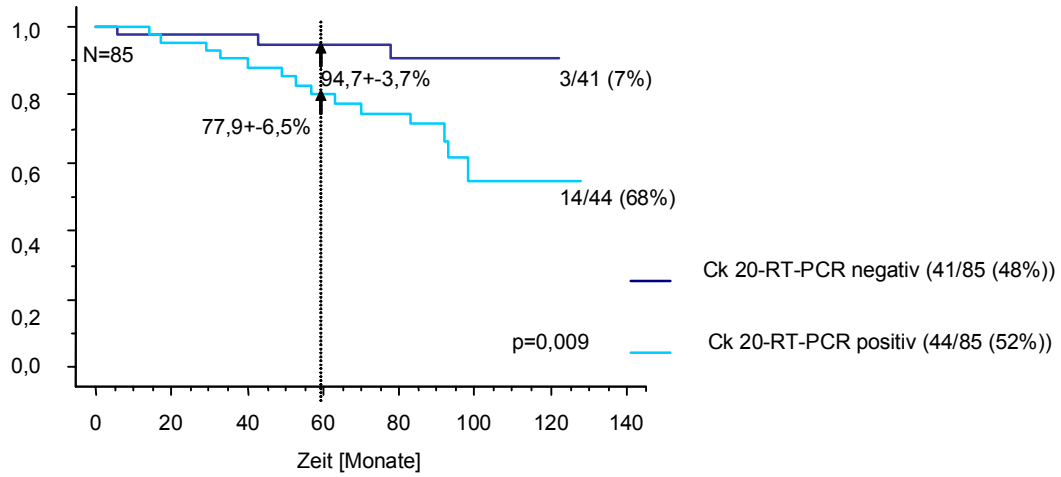

Abb. 5.1: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Patienten mit positiver Ck 20-RT-PCR vs Patienten mit negativer Ck 20-RT-PCR

5.2.4 Univariate und multivariate Analyse

Wir fanden in der **univariaten Überlebensanalyse** einen signifikanten Unterschied für die Tumorlokalisation, positiven Ck 20-m-RNA-Nachweis und Lymphangiosis carcinomatosa. Keine Korrelation mit dem Überleben fand scih für die **klinisch-histopathologischen** Parameter pT-Kategorie, UICC-Stadium, Grading, Serum-CEA-Level, Alter oder Geschlecht (s. Tab 5.1).

Die **multivariate Überlebensanalyse** wurde nur bezüglich der univariat signifikanten Parameter durchgeführt und wies die **Ck 20-RT-PCR** als stärksten unabhängigen Prognosefaktor aus, der das Gesamtüberleben mit einem relativen Risiko von 3,9 (KI= 1,1-13,7) beeinflusst (s. Tab. 5.3). Weitere unabhängige Variablen waren die Tumorlokalisation (RR 3,4) und das Auftreten einer Lymphangiosis carcinomatosa (RR 4,4).

Tab. 5.3: Uni- und multivariate Überlebensanalyse mit Ck20-RT-PCR und klinischen und histopathologischen Parametern (Cox-Regressions-Analyse)

Parameter	Kategorie	Univariate Analyse p	Multivariate Analyse p	Realtives Risiko	Konfidenz-Intervall
Ck 20 RT-PCR	: positiv vs negativ	< 0.02	<0,03	3,9	1,1-13,7
Tumorlokalisation	: Kolon vs Rektum	<0,002	<0,003	3,4	1,3-9,1
Geschlecht	: männlich vs weiblich	ns			
Alter	: kontinuierlich	ns			
pT Kategorie	: pT1 vs pT2 vs pT3 vs pT4	ns			
Stadium	: UICC I vs II	ns			
CEA-Level	: <5 [µg/l] vs > 5 [µg/l]	ns			
Grading	: schlecht vs mäßig vs gut	ns			
Lymphangiosis	: vorhanden vs nicht vorh.	<0,07	<0,03	4,4	1,3-15,1

ns= nicht signigikant

5.3 CEA RT-PCR

5.3.1 Detektionshäufigkeiten

Bei **41** (48%) der 85 Patienten mit kolorektalem Karzinom im UICC-Stadium I / II war die **CEA- RT-PCR** in den peritumoralen Lymphknoten positiv. Wir fanden positive CEA-RT-PCR Ergebnisse häufiger bei Männern (58%) als bei Frauen (41%) (p>0,05) und häufiger bei jüngeren als bei älteren Patienten (p>0,05). CEA m-RNA wurde signifikant häufiger in Lymphknoten von Kolon- als von Rektumkarzinomen detektiert (p<0,2) (s. Tab. 5.1).

5.3.2 Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern

Bei 58% der Patienten mit Kolonkarzinom war der CEA-m-RNA Nachweis positive und damit **signifikant** häufiger als bei Rektumkarzinomen. Ebenso war die CEA-RT-PCR signifikant häufiger positiv bei den Patienten im UICC-Stadium II als im UICC-Stadium I sowie bei nicht nachgewiesener Lymphangiosis carcinomatosa. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich für die Parameter Geschlecht, Grading, pT-Kategorie und präoperativer Serum-CEA-Level.

5.3.3 Rezidivauftreten und Überleben

Von den 41 Patienten mit **CEA-RT-PCR-positiven** Lymphknoten entwickelten 14 (34%) ein **Rezidiv**, an dem sie verstarben. Bei den 44 Patienten **ohne CEA**-Expression entstand in 4 (9%) Fällen ein Rezidiv. Unter der Annahme, dass bei allen Patienten mit später aufgetretenem Rezidiv Tumorzellen in den Lymphknoten nachweisbar sind, gelten diese Patienten als „falsch negativ" detektiert. 40 (91%) der 44 CEA-negativen Patienten blieben rezidivfrei. Insgesamt starben 10 Patienten krebsunabhängig, so dass am Ende der Nachsorgezeit noch 57 (67%) Patienten lebten (s. Tab. 5.4).

Tab. 5.4: Korrelation CEA-RT-PCR und Rezidivrate

	CEA PCR (+)	CEA PCR (-)	gesamt
Rezidiv (+)	14 (34%)	4 (9%)	18 (21%)
kein Rezidiv (-)	27 (66%)	40 (91%)	67 (79%)
	41 (48%)	44 (52%)	n=85
R (-) und krebsunabh. verstorben	4 (9%)	6 (15%)	10 (12%)
R (-) und lebend	25 (29%)	32 (78%)	57 (67%)

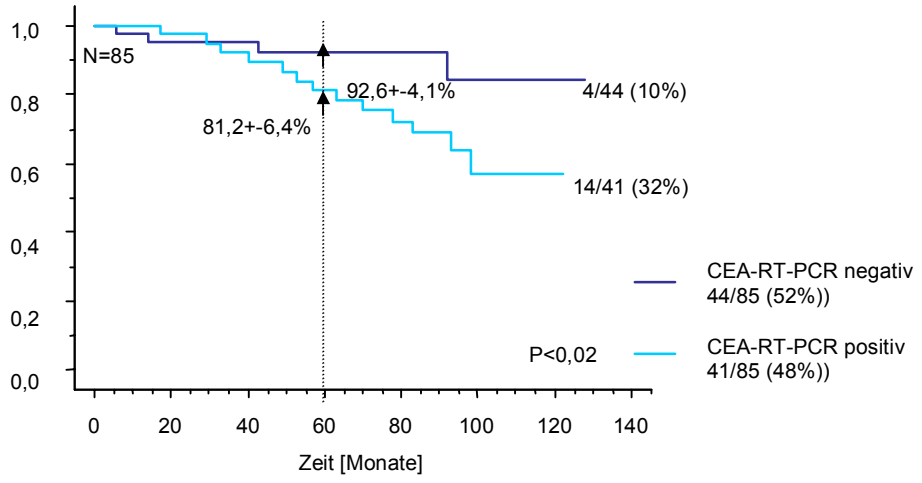

Abb. 5.2: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Patienten mit positiver CEA-RT-PCR vs Patienten mit negativer CEA-RT-PCR

Der positive CEA-Nachweis war mit der Anzahl der aufgetretenen **Rezidive** in den jeweiligen Tumorstadien **korreliert**: 2 (28%) der 7 T_1-Patienten, 6 (40%) der 15 T_2-Patienten, nur 7 (13%) der 55 T_3- und 3 (38%) der 8 T_4-Tumoren rezidivierten.

Die **5-Jahres-Überlebensrate** für die Patienten mit CEA-m-RNA-Nachweis in den Lymphknoten war mit 81,2%+-6,4% **signifikant** schlechter als für die Patienten mit negativer CEA-RT-PCR (92,6%+-4,1%) ($p<0.02$)(s. Abb. 5.2).

5.3.4 Univariate und multivariate Analyse

Ein **univariater** Vergleich unserer Ergebnisse für die CEA-RT-PCR mit klinisch-histopathologischen Daten zeigt eine **signifikante Korrelation** zwischen dem Überleben und den Variablen positive CEA-RT-PCR, Tumorlokalisation, UICC-Stadium und Lymphangiosis carcinomatosa in den peritumoralen Lymphknoten als unabhängige prognostische Faktoren. **Keine**

Korrelation bestand dagegen für die Parameter pT-Kategorie, Grading, Serum CEA-Level, Alter und Geschlecht.

Die multivariate Überlebensanalyse mit den univariat signifikanten Parametern zeigte, dass die Tumorlokalisation mit einem relativen Risiko von 4.1 (KI=1,5-11,1) und eine vorhandene Lymphangiosis carcinomatosa mit einem relativen Risiko von 3,2 (KI=1,0-10,4) unabhängige Prognosefaktoren sind. Für die CEA-RT-PCR konnten wir multivariat **keine unabhängige prognostische Signifikanz** feststellen (s. Tab. 5.5).

Tab. 5.5: Uni- und multivariate Überlebensanalyse mit CEA-RT-PCR und klinischen und histopathologischen Parametern (Cox-Regressions-Analyse)

Parameter	Kategorie	Univariate Analyse p	Multivariate Analyse p	Realtives Risiko	Konfidenz-Intervall
CEA RT-PCR	: positiv vs negativ	<0,03	ns		
Tumorlokalisation	: Kolon vs Rektum	<0,003	<0,05	4,1	1,5-11,1
Geschlecht	: männlich vs weiblich	ns			
Alter	: kontinuierlich	ns			
pT Kategorie	: pT1 vs pT2 vs pT3 vs pT4	ns			
Stadium	: UICC I vs II	<0,03	ns		
Grading	: schlecht vs mäßig vs gut	ns			
CEA-Level	: <5 [µg/l] vs > 5 [µg/l]	ns			
Lymphangiosis	: vorhanden vs nicht vorh.	<0,05	<0,05	3,2	1,0-10,4

ns= nicht signigikant

5.4 Vergleich der CEA- und Ck 20 RT-PCR

5.4.1 Detektionshäufigkeiten

Eine **positive CEA- als auch Ck 20-RT-PCR** in den peritumoralen Lymphknoten fanden wir bei 34 (40%) Patienten. Für beide Marker **negativ** waren 35 (41%) Patienten. In 16 (19%) Fällen war **nur einer** der beiden Marker detektierbar (Ck 20(+)/CEA(-): 9 (10%), Ck 20(-)/CEA(+): 6 (7%)) (s. Tab.5.6). Bei Lokalisation des Primärtumors im Kolon ergab sich eine

signifikant höhere Detektionshäufigkeit für CEA- und Ck 20 m-RNA als im Rektum ($p<0,005$) (s. Tab 5.1).

5.4.2 Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern

Die **CEA-und Ck 20-RT-PCR** wurde signifikant häufiger bei Patienten mit Kolon- als mit Rektumkarzinom nachgewiesen. Im UICC-Stadium II waren ebenfalls signifikant mehr Patienten als im Stadium I testpositiv. Alle anderen untersuchten Variablen erbrachten keine signifikanten Werte.

5.4.3 Rezidivauftreten und Überleben

Von den 34 (40%) Patienten mit **CEA- als auch Ck 20 positiven** Lymphknoten entwickelten 8 (23%) ein **Rezidiv**, an dem sie verstarben. Bei den 35 (41%) Patienten **ohne CEA**- und **Ck 20-**Expression entstand in 3 (9%) Fällen ein Rezidiv, so dass diese „falsch negativ“ klassifiziert wurden, sofern angenommen werden kann, dass bei allen Patienten, die ein Rezidiv entwickeln, Tumorzellen in den Lymphknoten nachweisbar sind. 32 (91%) der 35 CEA-und Ck 20-negativen Patienten blieben rezidivfrei. Von den 16 (19%) Patienten mit **nur einem positiven** Marker entwickelten 7 (43%) ein Rezidiv (s. Tab. 5.6).

Der CEA- und Ck 20-m-RNA-Nachweis **korrelierte** mit der Rezidivhäufigkeit in den jeweiligen Tumorstadien: 2 (28%) der 7 pT_1-Patienten, 6 (40%) der 15 pT_2-Patienten, 7 (13%) der 55 pT_3- und 3 (38%) der 8 pT_4-Patienten bildeten ein Rezidiv (s. Tab. 5.1).

Tab. 5.6: Korrelation Ck20-und CEA-RT-PCR und Rezidivrate

	CEA-RT-PCR (+) Ck20 RT-PCR (+)	CEA-RT-PCR (-) Ck20 RT-PCR (-)	CEA-RT-PCR (+) Ck20 RT-PCR (-)	CEA-RT-PCR (-) Ck20 RT-PCR (+)	gesamt
Rezidiv (+)	13 (37%)	2 (6%)	1 (17%)	2 (22%)	18 (21%)
kein Rezidiv (-)	22 (63%)	33 (94%)	5 (83%)	7 (78%)	67 (79%)
	35 (41%)	35 (41%)	6 (7%)	9 (11%)	n=85
R (-) und krebsunabh. verstorben	4 (12%)	6 (18%)	0	0	10 (12%)
R (-) und lebend	10 (29%)	24 (69%)	5 (31%)	5 (31%)	57 (67%)

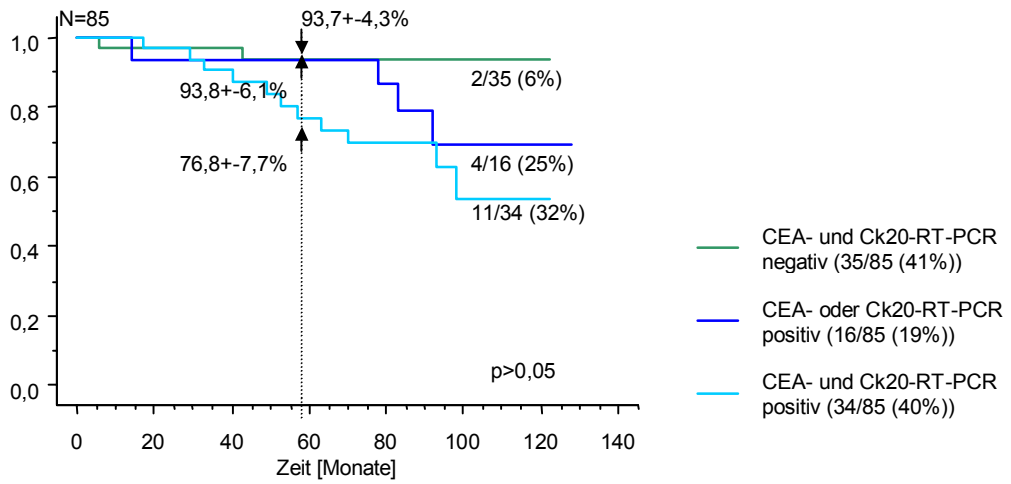

Abb. 5.3: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Patienten mit negativer CEA- u. Ck20-RT-PCR, mit positiver CEA- oder Ck20-RT-PCR und mit positiver CEA- u. Ck20-RT-PCR

Die **5-Jahres-Überlebensrate** für die Patienten mit positiver Ck 20- und CEA-RT-PCR in den Lymphknoten war mit 76,8%+-7,7% **nicht signifikant**

schlechter als für diejenigen ohne CEA- und Ck 20-Expression (93,7% +-4,3 %) (p>0,05) oder für die Patienten mit nur einem positiv detektierten Marker (CEA(+)/Ck 20(-) oder CEA(-)/Ck 20(+)), deren 5-Jahres-Überlebensrate 93,8%+-6,1% betrug (s. Abb. 5.3.).

5.4.4 Univariate und multivariate Analyse

Die **klinisch-histopathologischen** Parameter Tumorlokalisation, UICC-Stadium und positive Ck 20- und CEA-RT-PCR in den peritumoralen Lymphknoten **korrelierten univariat signifikant** mit dem Überleben. Keine Korrelation wurde festgestellt für pT-Kategorie, Grading, Serum-CEA-Level, Lymphangiosis carcinomatosa, Alter oder Geschlecht.

Die **multivariate Überlebensanalyse** mit den univariat signifikanten Parametern zeigte, dass die Tumorlokalisation **signifikant** mit dem Überleben korreliert ist (s. Tab. 5.7).

Tab. 5.7: Multivariate Überlebensanalyse mit CEA- und Ck20-RT-PCR und klinischen und histopathologischen Parametern (Cox-Regressions-Analyse)

Parameter		Univariate Analyse p	Multivariate Analyse p
Ck20-/CEA-RT-PCR	: positiv vs negativ	<0,01	ns
Tumorlokalisation	: Kolon vs Rektum	<0,003	0,005
Geschlecht	: männlich vs weiblich	ns	
Alter		ns	
pT Kategorie	: pT1 vs pT2 vs pT3 vs pT4	ns	
Stadium	: UICC I vs II	<0,03	ns
Grading	: schlecht vs mäßig vs gut	ns	
CEA-Level	: <5 [µg/l] vs > 5 [µg/l]	ns	
Lymphangiosis	: vorhanden vs nicht vor.	ns	

ns= nicht signigikant

6 DISKUSSION

6.1 Methode

6.1.1 Asservation der Lymphknoten und Probenaufbereitung

Wir untersuchten in unserer Studie zwei **peritumorale** Lymphknoten pro Patienten, und simulierten somit eine Situation, die in der klinischen Routine durchführbar ist, da sie einen relativ geringen Zeit-, Material- und Kostenaufwand erfordert. Kritisch muss angemerkt werden, dass diese Methode, die sich an das „sentinel-node-Konzept“ anlehnt, jedoch nicht repräsentativ für alle entnommenen Lymphknoten, da auch „falsch negative“ Ergebnisse möglich sind, wenn nicht jeder dieser Lymphknoten von Tumorzellen involviert ist. So bestehen in ca. 0,5% der Fälle negative sentinel-Lymphknoten obwohl weiter entfernte Lymphknoten positiv sind (**Skip-Metastasierung**) [50,S.VI][1,S.1128]. Negative Lymphknoten-Analysen können aber auch aufgrund technischer Probleme auftreten, wie zum Beispiel durch den m-RNA-/oder cDNA-Abbau durch RNasen vor oder während der Amplifizierung, durch Fehler bei der maschinellen Durchführung der RT-PCR oder durch Verlust der amplifizierten cDNA vor oder während der elektrophoretischen Darstellung.

Die mikroskopische Untersuchung der H.E.-gefärbten Lymphknoten zeigte, dass die Proben von **3** Patienten nicht verwendbar waren, da sie durch Primärtumorgewebe **kontaminiert** waren.

Bei **2** Patienten war die RNA-Extraktionsmenge elektrophoretisch kontrolliert nicht ausreichend, so dass eine Degradation durch Unterbrechung der **Kühlkette** oder durch die Kontamination mit **RNasen** angenommen wurde. Von beiden Lymphknoten-Proben konnten erneut in ausreichender Menge Kryomikrotomschnitte angefertigt und noch ausreichend intakte RNA extrahiert werden.

Um die Integrität der RNA und deren beständigen Gehalt in den Proben auch in den nachfolgenden Arbeitsschritten kontrollieren zu können, führten wir bei allen Proben eine **RT-PCR mit ß-Mikroblobulin-Primern** durch und bestätigten damit, dass in allen RT-PCR-Ansätzen genügend RNA vorhanden war.

6.1.2 RT-PCR-Methode

Für die RT-PCR-basierte Detektion von Tumor-m-RNA in peritumoralen Lymphknoten verwendeten wir Primer für die molekularen Marker **Ck 20** und **CEA**. Mehrere Arbeitsgruppen verwenden diese Marker zur RT-PCR-Detektion „mikrometastatischer Tumorzellen".

Die bisher publizierten Daten zeigen einen statistischen Trend bezüglich der Korrelation der RT-PCR-Ergebnisse mit dem Patientenüberleben[14,S.39] [57,S.1830]. Die Interpretation der verschiedenen Ergebnisse und die Beurteilung ihrer **klinischen Signifikanz** ist schwierig und wird durch eine Vielzahl von **Problemen** mit der RT-PCR-Methode kompliziert:, Kontamination der Proben, illegitime Transkription, die Detektion biologisch inaktiver Tumorzellen (dormant cells), fehlende klinische Daten und unterschiedliche Sensitivität oder Spezifität der angewandten Methoden machen den direkten Vergleich der Studien unmöglich[14,S.38][34,S.3419].

Die Auswahl der **tumorspezifischen Primer** für die m-RNA-targets beeinflusst die Spezifität der PCR entscheidend. Futamura et al., 1998[14,S.36] konnte die Nachweishäufigkeit durch die Anwendung einer nested-RT-PCR mit CEA- und Ck 20-Primern verbessern, was von uns bei der Etablierung der Methode aber nicht bestätigt werden konnte. Ebenfalls ausschlaggebend für die Spezifität ist der Einsatz absolut reiner Kontrollen und die gewählte annealing-Temperatur, denn bei zu niedrigen Temperaturen können die Primer an unspezifischen Stellen binden, deren Sequenz geringfügig von der Zielsequenz abweicht.

Die dargestellten Probleme verdeutlichen, wie wichtig eine Standardisierung dieser Methode ist, um die Ergebnisse verschiedener Studien vergleichen und um systematische Fehler ausschließen zu können. Zusätzlich müssen Fehler durch **Kontamination** bei der Probengewinnung oder fehlerhafte Amplifizierung ausgeschlossen werden.

Im Vergleich zu histologischen Methoden (H.-E.-Färbung, Immunhistologie, Serienschnitte), bei denen in der mikroskopischen Routineuntersuchung Mikrometastasen leicht übersehen werde[9,S.99][16,S.563] ist die RT-PCR sensitiver. Die **Reproduzierbarkeit** der Ergebnisse ist durch die bekannten Primersequenzen möglich und erweist sich als Vorteil gegenüber der Immunhistologie.

Ein **Nachteil** der RT-PCR liegt darin, dass die zu untersuchenden Zellen zerstört werden müssen. Anreicherungsverfahren mit antikörpergekoppelten beads gegen Tumorzellantigene zur Positivselektion - v.a. aus Blut - bieten dagegen den Vorteil, dass dabei die Zellen vital bleiben und für weitere Untersuchungsschritte verwendbar sind. Da m-RNA instabil ist, kann sie zudem nur aus schockgefrorenen oder sofort in Guanidin-Isothiocyanat fixierten Gewebeproben extrahiert werden, jedoch nicht aus Paraffinschnitten, die für retrospektive Studien angefertigt werden.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 CK-20 m-RNA Detektion in peritumoralen Lymphknoten

Primär gilt, dass innerhalb von Lymphknoten keine Epithelzellen vorkommen. Cytokeratin 20 wird daher als hochsensitiver und spezifischer Marker für die Detektion von disseminierten Tumorepitehlzellen angesehen, da **Pseudogene**, wie sie für Ck18 und Ck19 nachgewiesen wurden, für diesen Marker nicht bekannt sind. Damit kann eine wichtige Ursache für „**falsch-**

positiv“ detektierte Lymphknoten (s. Kap. 6.3) ausgeschlossen werden[49,S.120]. Die **Spezifität** dieses Markers wurde durch die von Jung et al., 1999[27,S.871] nachgewiesene Hintergrund-Expression in normalen Granulocyten aus Blut, Knochenmark und anderen Körperflüßigkeiten von nicht an Krebs erkrankten Patienten in Frage gestellt. Es wurde daher diskutiert, dass Ck 20 trotz der strengen Regulierung des Gens in nicht-epithelialen Zellen wie Granulocyten durch **low-level-transcription** exprimiert und in der RT-PCR detektiert werden könnte. Deshalb führten wir Kontrollen mit entzündlich veränderten Lymphknoten von nicht an Krebs erkrankten Patienten durch.

Yun et al., 2000[58,S.21] wies die **Gewebespezifität** (97,6%) von Ck 20 nach, da er belegt, dass es nur von Epithelzellen zu einem ausreichend hohen, in **single-round-RT-PCRs** detektierbaren Level exprimiert wird. Indem er die **Sensitivität** der Ck 20-Primer für die Detektion submikroskopische Lymphknoten-Metastasen in Korrelation mit tumorspezifischen K-ras-Mutations-nachweis durch histopathologischen Untersuchungen bewies, zeigte er die potentielle klinische Bedeutung der Ck 20-RT-PCR für die Detektion okkulter Mikrometastasen.

Die **signifikanten Korrelation** unserer positiven Ck 20-m-RNA-Detektion und kürzerem **Überleben** konnte bisher in von uns unabhängigen Studien nicht bestätigt werden. Weiterhin korrelierte die Ck 20-Positivität signifikant mit der Anzahl der **Rezidivfälle** und weist damit auf die klinische Relevanz der Ck 20-m-RNA-Detektion hin, die in prospektiven Studien weiter überprüft werden sollte.

6.2.2 CEA-m-RNA Detektion in peritumoralen Lymphknoten

Mori et al., 1995 [34,S.3417] berichtete über die Detektion von Tumorzellen in regionalen Lymphknoten von gastrointestinalen und von Mamma-Karzinomen mit denselben CEA-Primern, die auch wir in unserer Studie verwendeten. Obwohl diese Technik in verschiedenen Studien erfolgreich zum

Tumorzellnachweis in Lymphknoten anderer Karzinome verwendet wurde, und als aussagekräftige Methode für die Tumorzelldetektion anerkannt wurde, sind nur wenige CEA-Studien an Lymphknoten des KRK durchgeführt worden. Außerdem konnte bisher **keine** allgemeingültige Aussage über die **klinische Bedeutung** der Ergebnisse dieser Methode gemacht werden[34,S.3419].

Die einzige bisher veröffentlichte Studie, die eine **signifikante Korrelation** zwischen **CEA-m-RNA**-positiven regionalen Lymphknoten und der Überlebenszeit zeigte, wurde von Liefers et al., 1998[29,S.225] gemacht. Diese Studie umfasste jedoch nur 192 Lymphknoten von 26 Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium II. Bei 54% dieser Patienten wurde eine CEA-Expression nachgewiesen, und ihre **5-JÜLR** war mit 54% gegenüber 91% der Gruppe mit CEA-negativen Lymphknoten signifikant schlechter.

In unseren Untersuchungen war der **CEA-m-RNA**-Nachweis positiv mit dem Tumorstadium und dem Anteil der Rezidivfälle korreliert. Die **5-JÜLR** war für die CEA-positiven Patienten mit 81% signifikant schlechter als für die mit CEA-negativen Lymphknoten (5-JÜLR 93%)($p<0,02$).

Heute wird als Grund für die bisher fragliche klinische Relevanz dieser Methode angesehen, dass zwar die hohe Sensitivität der Methode die m-RNA-Detektion ermöglicht, aber die Zellen, die diese m-RNA exprimieren, nicht für die Entwicklung eines Rezidivs verantwortlich sind (s. Kap. 6.3). So ist bekannt, dass CEA von mesenchymalen Zellen des Lymphknotens **illegitim transkribiert** („low-level-transcription“) und exprimiert wird[42,S.1116][30,S.388], was zu falsch positiven RT-PCR-Ergebnissen führt. Dies widerlegt die frühere Meinung, dass das ektope Vorkommen von CEA als wichtiges m-RNA-target für die Detektion okkulter metastatischer Zellen in Lymphknoten beim kolorektalen Karzinom mit dem Vorliegen einer MRD gleichzusetzen ist, sofern eine Kontamination ausgeschlossen ist[14,S.38].

Unterschiedlich hohe **CEA-Expressionsraten** in Tumoren erschweren zudem die standardisierte Anwendbarkeit dieser Methode. Die **Komplexität** der CEA-

Expression [9,S.100] und ihre mögliche Heterogenität in den Tumor-assoziierten Lymphknoten spiegeln sich in unseren Daten wider. Wenig differenzierte Karzinome exprimieren weitaus weniger nachweisbares CEA als besser differenzierte. Auch Unterschiede in der Expression zwischen den histologischen Subtypen der Tumoren (tubulopapilläre/muzinöse Adenokarzinome) sind bekannt.

Wir konnten durch unsere Untersuchungen mit denselben Primern wie in der Studie von Liefers et al., 1998[29,S.224] **keine prognostische Bedeutung** für CEA nachweisen.

6.2.3 Ck 20- und CEA-m-RNA Detektion in peritumoralen Lymphknoten

Eine kombinierte **nested-RT-PCR für CEA und Ck 20** wurde von Futamura et al., 1998[14,S.34] an Lymphknoten von 13 Patienten mit kolorektalem Karzinom in einer Studie durchgeführt. Da von dieser Gruppe **keine Überlebensdaten** untersucht wurden, sind keine Korrelationen zwischen den angegebenen Detektionshäufigkeiten und klinischen Parametern möglich und die veröffentlichten Daten somit nicht mit anderen Studien vergleichbar.

In dieser Studie von Futamura et al., 1998[14,S.34] waren insgesamt **50,5%** (102 von 202) der untersuchten Lymphknoten positiv, davon 47% für CEA, 40% für Ck 20 und 36% für beide Marker. Von den CEA-positiven waren **78%** auch positiv für Ck 20, von den Ck 20-positiven waren **91%** positiv für CEA.

Wir wiesen in unserer Studie bei 34 (40%) der 85 Patienten eine **positive CEA- als auch Ck 20-RT-PCR** in den untersuchten peritumoralen Lymphknoten nach, wovon in 8 (26%) Fällen ein Rezidiv entstand (s. Tab. 5.1). Die Expressionsmuster für CEA und Ck 20 waren bei 69 (**81%**) von 85 Patienten identisch, in **19%** zeigten sie **unterschiedliche** Expressionsmuster. Wir fanden **CEA- und/oder Ck 20**-m-RNA in Lymphknoten von 50 der 85 Patienten (**58,8%**), während 44 (52%) und 41 (48%) Fälle für entsprechend

den einen bzw. den anderen Marker positiv waren. Wir detektierten bei den CEA-positiven Fällen in **83%** auch Ck 20-m-RNA, unter den Ck 20-positiven Patienten hatten **77%** auch einen positiven CEA-Nachweis.

Der Anteil der Patienten, die trotz negativem RT-PCR-Ergebnis ein Rezidiv entwickelten und prognostisch „**falsch negativ**“ detektiert gewertet werden müssen, kann durch die Kombination von Ck 20 und CEA nicht verringert werden (9% verglichen mit 9% bei CEA und 7% bei Ck 20). Die **Spezifität** der kombinierten Ck 20- und CEA-m-RNA-Detektion war in unserer Studie geringer als für die einzelnen Marker: Bei 26 (74%) Patienten, die rezidivfrei blieben, wurden prognostisch **„falsch positive“** Ergebnisse für beide Marker gefunden, für CEA und Ck 20 allein jeweils nur bei 66%.

Wir zeigten damit, dass die kombinierte CEA- und Ck 20-RT-PCR nur mit der **Rezidivhäufigkeit,** nicht aber mit der pT-Kategorie und dem Überleben (**5-JÜLR** 77%) korreliert ist und damit im Vergleich zur Untersuchung der Lymphknoten mit den beiden Markern einzeln **keinen zusätzlichen klinischen Nutzen** erbringt.

6.3 Tumorbiologische Interpretation der CEA- und Ck 20-Detektion mit der RT-PCR in peritumoralen Lymphknoten

6.3.1 Prognostisch „falsch positive“ und „falsch negative“ Ergebnisse

Obwohl unsere Ergebnisse wie auch schon andere Studien [14,S.38] eine signifikante Korrelation von RT-PCR-basierter Tumor-m-RNA-Detektion und der Prognose zeigen, stellt die RT-PCR uns vor noch ungelöste Probleme.

Die in unserer Studie sehr häufig nachgewiesene CEA- oder Ck 20-m-RNA bei 66% bzw. 68,2% (s. Tab. 5.1) der Patienten, die kein Rezidiv entwickelten, zeigt, dass die entdeckten Tumorzellen wegen ihrer biologischen Eigenschaften entweder keine klinische Relevanz haben (**dormant cells**),

oder dass während der Bearbeitung der Lymphknoten eine **Kontamination** stattgefunden hat, bzw. alle detektierten Tumorzellen durch die Lymphadenektomie (durchschnittlich 25 pro Patient) vollständig entfernt wurden und die Patienten dadurch tumorfrei geworden sind. Zusätzlich besteht das Problem der **illegitimen Transkription** durch die Existenz von Pseudogenen. Die Detektion von Tumor-m-RNA korreliert also nicht immer mit dem Überleben der Patienten oder dem Auftreten eines Tumorrezidivs.

Die Ursachen für **falsch-negativ** detektierten Fälle sind nicht geklärt, wir nehmen aber an, dass die zu amplifizierende Tumor-m-RNA bei der Lymphknoten-Verarbeitung durch Unterbrechung der Kühlkette oder durch RNAsen zerstört wurde, oder dass nicht genauer eruierbare Fehler in der RT-PCR aufgetreten waren.

6.3.2 Dormant cells

„Dormant cells“ sind in Lymphknoten disseminierte Tumorzellen, die biologisch inaktiv sind, da sie sich in der **G_0-Phase** befinden, in der sie nicht proliferieren. Sie stellen eine mögliche Ursache manifester Metastasen dar[50,S.VI]. Welche Faktoren diese „**dormancy“** als ausgeprägte Latenzzeit zwischen der Disseminierung und dem Auftreten klinisch manifester Metastasen bestimmen, ist jedoch noch unbekannt. In der RT-PCR sind diese Lymphknoten positiv, aber die metastatischen Zellen besitzen keine **maligne Potenz** – oder entwickeln sie erst nach Verstreichen einer gewissen Latenzzeit. Welche Wachstumsbedingungen innerhalb eines Lymphknotens gegeben sein müssen, und welche **Proliferationsfaktoren** die **biologische Aktivität** dieser mikrometastatischen Tumorzellen regeln, ist bisher ebenfalls noch unklar[41,S.1242].

Eine Studie von Natsugoe et al., 1998[36,S.858], die nicht-signifikante Ergebnisse ergab, stützt die These, dass die nachgewiesenen Tumorzellen in den Lymphknoten keine **biologisch aktiven Metastasen** sind, sondern

Epiphänomene mit nur geringer Bedeutung für die Prognose. Um aber exakte Aussagen über die klinische und prognostische Bedeutung der dormant cells machen zu können, und um Kenntnisse über die Faktoren zu erhalten, die die Tumorzellaktivität regulieren, sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

Ein anderer Grund, warum manche der gefundenen Tumorzellen inaktiv sind, kann die immunologische **Filterfunktion** der Lymphknoten sein, denn die primär drainierenden Lymphknoten besitzen die strukturelle und funktionelle Fähigkeit, eingeschwemmte Tumorzellen effizient zu bekämpfen. Auch hier sind die Faktoren, die diesen Vorgängen zugrunde liegen, noch unbekannt. Durch eine defiziente Expression von **MHC-Klasse I**-Molekülen auf diesen dormant cells wird die Elimination dieser Zellen durch phagozytotische Zellen behindert. Dadurch wird das Vorhandensein einer MRD oft viele Jahre lang vom Immunsystem nicht erkannt[25,S.1296].

Da sich solche inaktiven G_0-Phase-Zellen der Wirksamkeit der antiproliferativen Chemotherapie entziehen, bestehen neue therapeutische Möglichkeiten im Einsatz von Antikörpern gegen Oberflächenantigene wie dem Adhäsionsmolekül 17-1 A. Die Wirksamkeit einer solchen **Antikörpertherapie** konnte bei R_0-resezierten KRK im Stadium UICC III in einer randomisierten Studie bestätigt werden[41,S. 1247].

6.3.3 Illegitime Transkription

Falsch-positive RT-PCR-Ergebnisse können nach einer von Jung et al., 1999 [27,S.871] durchgeführten Studie auch durch die Amplifizierung **unspezifischer m-RNA-targets** verursacht werden und ein weiteres Problem für diese sensitive molekularbiologische Methode darstellen. Eine solche ektope, illegitime Transkription ist definiert als „**low-level-transcription**“ gewebespezifischer Gene in nicht-spezifischen Zellen und wurde von Henke, Loening et al., 1998 [19,S.164] für eine große Anzahl von Genen wie z.B. Ck19 beschrieben, und wird als ein Transkript pro 10^2 bis 10^3 Zellen definiert.

Innerhalb des Lymphknotens ist dieses Phänomen sowohl für CEA als auch für verschiedene Cytokeratine bekannt und findet in Mesenchymzellen wie Fibroblasten, lymphatische und endotheliale Zellen statt. Liegen diese Zellen im Überschuss vor, können dadurch die RT-PCR-Ergebnisse verfälscht werden[41,S.1245]. Da unsere Negativkontrollen (Lymphknoten von Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung) in allen Fällen negativ waren, konnten wir dieses Problem nicht beobachten.

Ck 20 wird in den Zellen des lymphatischen Gewebes nicht exprimiert. Für diesen Marker ist auch -im Gegensatz zu Ck 18 und 19- kein **Pseudogen** bekannt[17,S.612], womit eine wichtige Ursache für falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden kann[49,S.120]. So waren bei Gunn et al., 1996[17,S.614] und auch in unserer Studie alle Negativkontrollen in der RT-PCR für Ck 20 negativ. Dies zeigt die Spezifität dieses Markers. Unter der Voraussetzung, dass eine Kontamination der Proben vermieden wurde, ist daher das ektope Vorhandensein der Ck 20-m-RNA in Lymphknoten ein Anzeichen für die okkulte Präsenz metastatischer epithelialer Zellen.

Die Aussagekraft der RT-PCR-Technik ist **limitiert**, wenn die RT-PCR-Ansätze nicht nur reine cDNA sondern auch Anteile **genomischer DNA** enthalten. Aus diesem Grund wurden in neueren Studien Primer für Ck19 und Ck 20 designed, die zwischen cDNA und DNA differenzieren können. So können die cDNA-abhängigen PCR-Produkte nicht durch Ck19-Pseudogen-bedingte Amplifikation verfälscht werden oder etwa an anderen DNA-Abschnitten binden[17,S.611].

Eine **Lösung** für das Problem der illegitimen Transkription könnte die Verwendung von **quantitativen PCR-Techniken** sein, womit ein cut-off-level für ein gegebenes Primerpaar festgesetzt werden könnte, ab dem dann entsprechende RT-PCR-Ergebnisse als positiv zu betrachten sind.

6.3.4 Kontamination

Eine **Einzelzellkontamination** der eingesetzten Proben kann intra- oder postoperativ stattfinden und könnte möglicherweise die hohe Rate der positiven Ergebnisse bei den Patienten ohne Rezidiv (CEA: 66%, Ck20: 68%; s. Tab. 5.1) erklären, über die bereits in anderen Studien in der Literatur berichtet worden ist[14,S.35][11,S.109][10,S.1310]. Sie kann dadurch vermieden werden, dass die Lymphknoten vor dem Öffnen des Darmlumens mit einem gesonderten Präparations-Instrumentarium entfernt werden, das auch für die Entnahme der einzelnen Lymphknoten jedes Mal gewechselt wird. Durch Spülen in Kochsalzlösung können noch adhärente Tumorzellen entfernt werden.

Während der Anfertigung der histologischen **Schnittserien** kann eine Kontamination zwischen den einzelnen Lymphknoten-Blöcken durch Abflammen der verwendeten Instrumente und des Kryomikrotommessers mit Ethanol vermieden werden[21,S.110]. Die Dekontamination des Arbeitsplatzes erfolgt mit **UV-Licht**, das die im Vergleich zur RNA relativ stabile DNA zerstört, die als Kontaminationsquelle der RT-PCR-Ansätze bekannt ist.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass nach der RNA-Extraktion im Ansatz noch **genomische DNA** enthalten ist[29,S.223]. Sie kann dadurch nachgewiesen werden, dass Material eines zuvor positiv detektierten Lymphknoten ohne Zugabe der reversen Transkriptase (RT) in die PCR eingesetzt wird, sofern für die RT-PCR kein one-tube System verwendet wird[34,S.3418].

Falsch positive Ergebnisse sind aber auch dadurch möglich, dass aus degenerierten Tumoren **DNA-Fragmente** freiwerden und in die Lymphknoten ausgeschwemmt werden. Dort werden sie in phagozytäre Zellen aufgenommen und prozessiert. Enthalten sie eine Targetsequenz, die in der RT-PCR amplifiziert wird, werden die Ergebnisse somit durch das nur scheinbare Vorhandensein neoplastischer Zellen fehlinterpretiert[2,S.200]. Durch **immunhistologische** Methoden könnte phagozytiertes Proteinmaterial

nachgewiesen werden [50,S.VI]. Als zusätzliche Untersuchung könnte dies die Wertigkeit der RT-PCR verbessern, da allein mit molekularbiologischen Methoden keine **morphologische** Beurteilung der Lymphknoten möglich ist. Auch mit der von uns durchgeführten H.E.-Färbung konnten Kontaminationen durch Einzelzellen nicht sicher ausgeschlossen werden.

6.4 „Sentinel"-Lymphknoten Untersuchung

Der erste den Primärtumor und seine Umgebung drainierende Lymphknoten wird aufgrund seiner Filterfunktion als „Wächter"-Lymphknoten **„sentinel"**-Lymphknoten (SN) genannt. Sein Status soll die größte prognostische Bedeutung haben und Aussagen über den Befall weiter entfernter regionaler Lymphknoten möglich machen[1,S.1128].

Wenn diese Lymphknoten frei von Tumorzellen sind, wird dies als Indikator dafür angesehen, dass kein Lymphknoten-Involvement stattgefunden hat, oder dass die disseminierten Zellen inaktiviert wurden, denn hier können eingeschwemmte Tumorzellen durch spezielle strukturelle und funktionelle Eigenschaften effizient bekämpft werden[50,S.VI]. Ihr Befall durch disseminierte maligne Zellen erhöht das Risiko der Rezidiventstehung und kann somit ausschlaggebend für die Prognose des Patienten sein. Das Vorliegen eines negativen sentinel-Lymphknotens bei weiter entfernten positiven Lymphknoten ist dabei sehr selten und wird als **Skip-Metastasierung** bezeichnet (in ca. 0,5% der Fälle vorhanden)[50,S.VI][1,S.1128].

Mit der **Ck 20-RT-PCR** und der **Ck 20-Immunhistologie** fand Bilchik et al., 2001 [1,S.1128] Mikrometastasen bei 53% der Patienten, deren SN in der Routine-H.E.-Färbung negativ waren (16 von 30 H.E.-negativen von insgesamt 40 Ptn.). Dabei waren in dieser Studie nicht-sentinel-Lymphknoten (durchschnittlich 15 pro Fall) nie positiv, wenn alle zugehörigen sentinel-Lymphknoten histopathologisch negativ waren. In den 30 H.E.-negativen

Fällen (75%) war die Ck-Immunhistochemie bei 4 Proben (10%) positiv. Die restlichen 26 Patienten ohne nachweisbares SN-Involvement in H.E. und Ck-IHC hatten 12 (46%) positive RT-PCR-Ergebnisse. Dabei wurde die Anzahl der exprimierten Marker (in der PCR) in den SN mit dem T-Stadium des Primarius korreliert ($p<0,04$): es gab eine 79%-ige Konkordanz in der Markerexpression für die Paare (n=38) Primärtumor und histopathologisch positiver SN sowie eine 86%-ige Konkordanz (12 von 14) zwischen positiver RT-PCR und histopathologisch positiven SN [1,S.1128].

Eine ausgedehnte Lymphknotendissektion, die die perioperative Morbidität und sogar die Mortalität erhöhen kann, könnte durch den Einsatz dieser Methoden umgangen werden und verdeutlicht die Wichtigkeit des „sentinel-node"- Konzepts.

6.5 Prognostische Bedeutung

Diese Studie zeigt, dass ein positiver Ck 20-RT-PCR-Nachweis als Äquivalent einer MRD in zwei ausgewählten peritumoralen Lymphknoten ein unabhängiger Prognosefaktor für Patienten mit histopathologisch tumorfreiem (pN_0) kolorektalem Karzinom der UICC Stadien I und II ist.

Eine Vielzahl bisheriger Studien, die den Nutzen der Tumor-m-RNA Detektion bei kolorektalen Karzinomen untersucht haben, zeigten lediglich einen statistischen Trend bezüglich der Korrelation mit geringerem Patientenüberleben[14,S.39][57,S.1830]. Die hohe Rate der Ck 20 und/oder CEA-m-RNA-Detektion von 75% in Lymphknoten unserer Patienten, die während des Nachbeobachtungszeitraumes ein **Lokalrezidiv** oder **Fernmetastasen** entwickelten, verdeutlicht noch einmal die potentielle Rolle von Ck 20 als Marker für die Detektion von **prognostisch relevanten** Tumorzelldisseminierung bei diesem Patientenkollektiv.

Die **klinische Bedeutung** der molekularen Detektion von Mikrometastasen wird vor allem durch ihre Auswirkung auf die Prognose des einzelnen Patienten und die durch sie einzufordernde Indikation zu einer **adjuvanten Therapie** bestimmt, da trotz **scheinbar kurativer** Resektion ($pN_0pM_0R_0$) im UICC-Stadium I oder II 30-40% der Patienten nach 5 Jahren eine systemische Erkrankung entwickeln.

Der **prädiktive Wert** des UICC-Staging-Systems scheint daher für die Stadien I und II noch zu verbessern zu sein. Sie enthalten Subkollektive mit unterschiedlichen Prognosen, da bei einem Teil der Patienten bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung okkulte Mikrometastasen in den perikolischen Lymphknoten vorhanden sind, woraus ein **Understaging** resultiert. Die **5-Jahres-Überlebensrate** dieser Patienten von 54%-85% wird durch die MRD signifikant beeinflusst[30,S.385][14,S.34][29,S.223]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass durch ein molekulares **„super"-Staging** die Genauigkeit der Prognose des einzelnen Patienten erhöht werden kann.

Sobald das bisher vor allem bei Melanomen und Mammakarzinomen untersuchte und angewandte **sentinel-Lymphknoten-Konzept**[50,S.VI] auch für die allgemeine Anwendung beim KRK außerhalb von Studien möglich ist, kann das Subkollektiv mit erhöhtem Rezidivrisiko einem prognoseverbessernden Therapieschema in Form einer **adjuvanten Chemo-/ Antikörpertherapie** zugeführt werden.

Das **Resektionsausmaß** hinsichtlich der „radikulären Lymphadenektomie" und die postoperativen Komplikationen können durch die Untersuchung der sentinel-Lymphknoten möglicherweise vermindert werden[50,S.VI]. Die Menge des entnommenen und für die pathologische Diagnostik zur Verfügung stehende Untersuchungsmaterial in Form eines Lymphknotens ist somit zwar sehr gering, ist aber für die Tumorzelldetektion durch die hochsensitive RT-PCR-Methode ausreichend.

Derzeit werden Patienten mit **Kolonkarzinom** im Stadium II ($T_{3-4}N_0M_0R_0$) nur innerhalb von Studien adjuvant chemotherapeutisch behandelt. Für **Rektumkarzinome** des Stadiums II gilt die Empfehlung der Nachbehandlung mit dem NCI-Protokoll (Radiochemotherapie mit 6 Zyklen 5-FU [Mayo-Schema] und 45 Gray postoperativer Radiatio).

Die **therapeutische Relevanz** der Tumorzelldetektion in scheinbar tumorfreien Lymphknoten beim kolorektalen Karzinom liegt darin, dass Patienten mit einer nachgewiesenen okkulten Metastasierung einer adjuvanten Therapie zugeführt werden sollten, nicht aber die Patienten mit RT-PCR-negativem Lymphknotenstatus, bei denen eine Tumorprogression unwahrscheinlich ist.

Die Angaben über Häufigkeiten von Mikrometastasen und ihre klinische und prognostische **Signifikanz** variieren stark zwischen den bisher publizierten Studien und spiegeln die Komplexität des metastatischen Prozesses wider, die die Interpretation der RT-PCR für die prognostische Vorhersage erschwert. Zudem entstehen nicht in allen positiv detektierten Fällen auch manifeste Rezidive [14,S.38]. Nur durch die **Standardisierung** der Patientenauswahlkriterien, der intraoperativen Probengewinnung sowie durch die Verwendung einheitlicher m-RNA-Targets, verbesserter RT-PCR-Methoden (quantitative RT-PCR-Methoden) und durch einheitliche klinische Nachsorgeprotokolle wird die prognostische Bedeutung verschiedener Studien vergleichbar.

6.6 Ausblick

Zur Klärung der klinischen und prognostischen Bedeutung der **Ck 20-m-RNA-Detektion** sind weitere **prospektive Studien** notwendig. Wenn mehrere verschiedene Studien einheitliche Ergebnisse liefern, könnte die gezielte Untersuchung der peritumoralen Lymphknoten im Sinne des „sentinel-node-

Konzepts“ und die Identifizierung eines submikroskopischem mikrometastatischem Lymphknotenbefalls im Sinne einer MRD als neue **Staging**-Methode zur Erkennung von Risikopatienten für die Entwicklung von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen angewandt werden und die bereits von der UICC aufgenommenen Bezeichnungen **„mi“ und „i“**[53] fester Bestandteil der Klassifizierung werden. In diesem postoperativen Stadium könnte die Überlebensrate der Patienten durch frühzeitige therapeutische Intervention im Sinne einer **adjuvanten Therapie** verbessert werden.

Die Anwendung der RT-PCR-Technik in anderen **Kompartimenten** wie dem Knochenmark oder dem peripheren Blut scheint vor allem für Ck 20-m-RNA ein brauchbarer Indikator zu sein[13,S.1327] und eröffnet auch hier innovative Forschungsansätze. Zur Verbesserung der molekularen Techniken muss der Einsatz **quantitativer RT-PCR**-Methoden[42,S.1117] oder **multimarker-RT-PCR**-Techniken untersucht und etabliert werden.

Die **Spezifität** der MRD-Detektion in peritumoralen Lymphknoten könnte durch zusätzliche Methoden verbessert werden, beispielsweise durch standardmäßiges **lymphatisches Mapping** durch Farbinjektion zur Darstellung der sentinel-Lymphknoten vor der en bloc-Resektion des tumortragenden Darmsegments.

Die **Kombination** der **RT-PCR** mit der **Immunhistochemie** (=IHC) zur morphologischen Beurteilung der Proben könnte dazu dienen, die wegen Tumorzellkontamination häufig falsch-positiv detektierten Lymphknoten herauszufiltern, da damit phagozytiertes Proteinmaterial wie z. B. CEA-Antigen innerhalb von Phagozyten ebenso wie **extrakapsulär** gelegene Tumorzellen nachgewiesen werden können. Dadurch könnte die Immunhistochemie als zusätzliche Untersuchung die **Spezifität** und den prognostischen Wert der RT-PCR-Ergebnisse verbessern[35,S.129].

7 ZUSAMMENFASSUNG

In einer **retrospektiven** Studie an 85 Patienten mit residualtumorfrei operiertem kolorektalen Karzinom (Klinikum Rechts der Isar, 08/88-02/95) der UICC-Stadien I und II ($pT_{1-4}N_0M_0$) wurde die prognostische Bedeutung der minimal residualen Tumorerkrankung evaluiert. Hierzu wurden zwei konventionell-histologisch kontrolliert tumorfreie peritumorale Lymphknoten mit einer neu entwickelten **RT-PCR** mit spezifischen Primern für **CEA und Ck 20** untersucht.

Einschlusskriterien waren onkologisch komplette Resektion mit radikaler Lymphadenektomie, Asservation von schockgefrorenem Primärtumorgewebe und mindestens zwei peritumoralen Lymphknoten und Vollständigkeit der klinischen Daten. **Ausschlusskriterien** waren eine neoadjuvante Radio-/ Chemotherapie, Probenkontamination mit Primärtumorgewebe, m-RNA-Degeneration sowie die 90-Tage-Letalität.

Bei 57 (67%) **Kolon-** und 28 (33%) **Rektumkarzinomen** befanden sich 22 (26%) Patienten im **UICC-Stadium** I, 63 (74%) Patienten im UICC-Stadium II. In der Nachbeobachtungszeit (Median 86 Monate) starben 18 (21%) Patienten am Rezidiv, 10 (12%) Patienten verstarben tumorunabhängig. Die **5-Jahres-Überlebensrate** im Gesamtkollektiv war 67%.

Die **Nachweisgrenze** war für beide Marker 1 Tumorzelle/10^6 mononukleäre Zellen. Die Spezifitätskontrollen an entzündlich veränderten Lymphknoten waren alle negativ. Ck 20-m-RNA wurde bei 44 (52%), CEA-m-RNA bei 41(48%), beide Marker bei 34 (40%) Patienten detektiert. Von den 18 Patienten mit **Rezidiv** waren 15 (83%) Ck 20-positiv, 14 (78%) waren CEA-positiv und 8 (44%) waren für beide Marker positiv.

In der **univariate** Analyse zeigte sich eine signifikante prognostische Bedeutung der CEA- und der Ck 20-RT-PCR, sowie der Tumorlokalisation

(Rektum vs. Kolon), des UICC-Stadiums (II vs. I) und der Lymphangiosis carcinomatosa. Die Variablen Grading, pT-Kategorie, CEA-Level, Alter und Geschlecht ergaben keine prognostische Bedeutung.

Die **Prognose** bei positiver Ck 20-RT-PCR war signifikant schlechter (5-JÜLR 78%) als bei negativem Test (5-JÜLR 95%). Bei positivem CEA-m-RNA-Nachweis (5-JÜLR 81% vs. 92%) ergab sich ebenfalls eine signifikante Prognoseverschlechterung.

In der multivariaten Überlebensanalyse aller Parameter ergab sich eine unabhängige prognostische Bedeutung für die positive Ck 20-RT-PCR (RR 3,9), die Tumorlokalisation (Rektum schlechter als Kolon; RR 3,4) und die Lymphangiosis carcinomatosa (RR 4,4).

Der kombinierte Nachweis von **CEA- und Ck 20 m-RNA** ergab keine Verbesserung der prognostischen Analysen.

Im Vergleich mit Literaturangaben konnten wir die von Liefers et al., 1998[29,S.225] nachgewiesene klinische Relevanz der CEA-m-RNA-Detektion bestätigen. Futamura et al, 1998[14,S.39] und Weitz et al, 1999[57,S.1830] fanden bezüglich der **prognostischen Signifikanz** der **Ck 20-RT-PCR** nur einen Trend zu kürzerem Überleben.

Durch die Ck 20-RT-PCR-Analyse war die Identifikation von Patienten mit schlechter Prognose möglich, die von einer adjuvanten Therapie profitieren könnten. Das Auftreten eines Rezidivs wäre in 83% der Patienten mit positivem Test vorhersagbar gewesen. Die prognostische Signifikanz der Ck 20-RT-PCR sollte daher nach Standardisierung der Methode in einer Konfirmationsstudie untersucht werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bilchik AJ, Saha S, Wiese D: Molecular staging of early colon cancer on the basis of sentinel node analysis: A multicenter phase II trial. J Clin Oncol 19 (2001) 1128-1136
2. Calaluce R, Miedema BW, Yesus YW: Micrometastases in colorectal carcinoma: a review. J Surg Oncol 67 (1998) 194-202
3. Cawthorn SJ, Gibbs NM, Marks CG: Clearence technique for the detection of lymph nodes in colorectal cancer. Br J Surg 73 (1986) 58-60
4. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP: (American Joint Committee on Cancer Prognostik Factors Consensus Conference, Colorectal Working Group): Prognostic factors for colorectal carcinoma. Cancer 88 (2000) 1739-1757
5. Compton C, Fielding L P, Burgart L J: Prognostic factors in colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med 124 (2000) 979-994
6. Cutait R, Alves VAF, Lopes LC: Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastases through immunoperoxidase staining of CEA and cytokeratins. Dis Colon Rectum 34 (1991) 917-920
7. Davidson BR, Sams VR, Styles J: Detection of occult nodal metastases in patients with colorectal carcinoma. Cancer 65 1990 967-970
8. Demeure MJ, Doffek KM, Komorowski RA, Wilson SD: Adenocarcinoma of the pancreas. Detection of occult metastases in regional lymph nodes by a polymerase chain reaction-based assay. Cancer 83 (1998) 1328-1334
9. Dorudi S: Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancer. Br J Surg 85 (1998) 98-100
10. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Gastrointestinale Tumoren. Manual, Tumorzentrum München an den medizinischen Fakultäten der LMU und der TU, München, Zuckschwerdt, Bern-Wien-New York, 2001, 6. Auflage, 215-243/244-265

11. Fujiwara Y, Ooka M, Sugita Y, Sakita I, Tamaki Y, Monden M: Prevention of cross-contamination during sampling procedure in molecular detection for cancer micrometastasis. Cancer Lett 153 (2000) 109-111
12. Funaki NO, Tanaka J, Hosotani R, Kogire M, Suwa H, Imamura M: Quantitative analysis of carcinoembryonic antigen m-RNA in peripheral venous blood and portal blood of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res 4 (1998) 855-60
13. Funaki NO, Tanaka J, Ohxhio G: Cytokeratin 20 m-RNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. Br J Cancer 77 (1998) 1327-1332
14. Futamura M, Takagi Y, Koumura H, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, Saji S: Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reactions for carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20. J Surg Oncol 68 (1998) 34-40
15. Gerhard S, Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. J Clin Oncol 12 (1994) 725-729
16. Greenson JK, Isenhart CE, Rice R, Mojzisik C, Houchens D, Martin EW Jr.: Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Dukes B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Cancer 73: (1994) 563-569
17. Gunn J, McCall JI, Yun K, Wright PA: Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Lab Invest 75 (1996) 611-616
18. Hayashi N, Egami H, Kai M, Kurusu Y, Takano S, Ogawa M: No-touch isolation technique reduces intraoperativ shedding of tumorcells into the portal vein during resection of colorectal cancer. Surgery 125 (1999) 369-74
19. Henke W, Loening S: Detection of illegitimate transcripts of prostate-specific antigen m-RNA in blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Int J Cancer 77 (1998) 164-165
20. Hermanek P, Sobin LH: Colorectal carcinoma, Prognostic factors in Cancer. UICC (Unité internationale contre le cancer), Springer, Heidelberg-New York,1995, 1. Auflage, 64-73

21. Hermanek P: Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. Anticancer Res 19 (1999) 2771-2774
22. Hermanek P, Hutter R, Sobin L: Classification of isolated tumorcells and micrometastases. Cancer 86 (1999) 2668-2673
23. Ichikawa Y, Ichikawa T, Momiyama N, Momiyama N, Yamaguchi S, Masui H, Hasegawa S, Chishima T, Takimoto A, Kitamura H, Akitaya T, Hosokawa T, Mitsuhashi M, Shimada H: Detection of regional lymph node metastasis in colon cancer using RT-PCR for matrix metalloproteinase 7, matrilysin. Clin Exp Metastasis 16 (1998) 3-8
24. Interdisziplinäre Leitlinie zur Therapie des Kolonkarzinoms. Forum Dt. Krebsgesellschaft 14 (1999) 132-146
25. Izbicki R, Hosch S, Hossfeld DK: Minimale residuale Tumorerkrankung bei soliden epithelialen Tumoren. Dt. Ärzteblatt 97 (2000) 1293-1298
26. Jeffers MD, O'Dowd GM, Mulcahy H, Stagg M, O'Donoghue DP, Toner M: The prognostic significance of immunohistochemically detected colorectal carcinoma. J Pathol 172 (1994) 183-187
27. Jung R: Detection of micrometastases by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. Br J Cancer 81 (1999) 870-873
28. Jung R, Ahmand-Nejad P, Wimmer M, Gerhard M, Wagener C, Neumaier M: Quality management and influential factors for the detection of single metastatic cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Review. Eur J Clin Chem Clin Biochem 35 (1997) 3-10
29. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ, Tollenaar RA: Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. N Engl J Med 339 (1998) 223-228
30. Liefers GJ, Tollenaar RAEM, Cleton-Jansen AM: Molecular detection of minimal residual disease in colorectal and breast cancer. Histopathology 34 (1999) 385-390
31. Miyake Y, Fujiwara Y, Ohue M, Yamamoto H, Sugita Y, Tomita N, Sekimoto M, Shiozaki H, Monden M: Quantification of micrometastases in lymph nodes of colorectal cancer by real-time fluorescence polymerase chain reaction. Int J Oncol 16 (2000) 289-293

32. Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW: Cytokeration 20 in human carcinomas: A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol 140 (1992) 427-447
33. Monson, Adjuvant therapy for colorectal cancer. Inpharma suppl. 4 (1996) 3
34. Mori M: Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer Res 55 (1995) 3417-3420
35. Mori M, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shiraishi T, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T: Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas, J Clin Oncol 16 (1998) 128-132
36. Natsugoe S, Mueller J, Stein HJ, Feith M, Hofler H, Siewert JR: Micrometastasis and tumour cell microinvolvement of lymph nodes from esophageal squamous cell carcinoma. Cancer 83 (1998) 858-866
37. Nekarda H., Roder, Stein, Fink: Kolon-/Rektumkarzinom, Therapie gastrointestinaler Tumoren. Springer, Heidelberg-New York, 2000, 1. Auflage, 336-365
38. Nekarda H: Faktoren der tumorinvasionsassoziierten Proteolyse als Prognoseparameter beim residualtumorfrei resezierten Magenkarzinom. Habilitationsschrift. Klinikum Rechts der Isar. 2000
39. Neumaier M, Gerhard M, Wagener C: Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissue-specific genes. Gene 195 (1995) 43-47
40. Oruzio D, Hempel D, Schlimok G: „Knochenmarksmikrometastasen“ epithelialer Tumoren. Onkologe 3 (1997) 66-72
41. Pantel K, von Knebel-Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmüller G: Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien. Chirurg 68 (1997) 1241-1250
42. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O: Detection and clinical importance of micrometastatic disease (Review). J Nat Canc 91 (1999) 1113-1124
43. Prävention und Diagnostik des kolorektalen Karzinoms, Birkner B, Münchner Ärztliche Anzeigen, Zuckschwerdt, Germering, 2002, Nr.10

44. Raj GV, Moreno JG, Gomella LG: Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumours. Cancer 8 (1998) 1419-1442
45. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Doglietto GB, Crucitti F: Prognostic Factors in colorectal Cancer. Dis Colon Rectum 41 (1998) 1033-1044
46. Riede UN, Schäfer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme, Stuttgart-New York, 1999, 4. Auflage, 336-365
47. Rosenberg R, Hoos A, Mueller J, Nekarda H: Impact of cytokeratin-20 and carcinoembryonic antigen m-RNA detection by RT-PCR in regional lymph nodes of patients with colorectal cancer. Br J Cancer 83 (2000) 1323-1329
48. Ruo L, Guillem JG: Surgical mamgement of primary colorectal cancer. Surg Oncol 7 (1998) 153-163
49. Ruud P, Fodstad O, Hovig E: Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. Int J Cancer 80: (1999) 119-125
50. Schlag S: The ”sentinel node” concept: more questions raised than provided?. Oncologist 3 (1998) VI-VII
51. Siewert JR: Chirurgie, Springer, Berlin-Heidelberg, 1998, 5. Auflage, 623-643
52. Sobin LH, Wittekind CH: UICC: TNM classifikation of malignant tumors (ed 5). John Wiley&Sons, New York, 1997
53. Schwartzberg LS.: Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal carcinoma. Crit Rev Oncol Hematol 40 (2001) 17-24
54. Tsavellas G, Patel H, Allen-Mersh TG: Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. Br J Surgery 88 (2001) 1307-1320
55. Waldmann SA, Cagir B, Rakinic J: Use of guanylyl cyclase C for detecting micrometastases in lymph nodes of patients with colon cancer. Dis Colon Rectum 41 (1998) 310-315
56. Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M: Dissemination of tumour cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. Clin Cancer Res 4 (1998) 343-348

57. Weitz J, Kienle P, Magener A, Willeke F, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M: Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. Clin Cancer Res 5 (1999) 1830-1836
58. Yun K, Merrie AEH, Gunn J, Phillips LV, McCall JL: Keratin 20 is a specific marker of submicroscopic lymph node metastases in colorectal cancer: Validation by K-ras mutations, J Pathol 191 (2000) 21-26
59. Zhang PJ, Reisner RM, Nangia R, Edge SB, Brooks JJ: Effectiveness of multiple-level sectioning in detecting axillary nodal micrometastasis in breast cancer. Arch Pathol Lab Med 122 (1998) 687-690

9 PUBLIKATION

Prognostic Significance of Cytokeratin-20 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction in Lymphnodes of Node-Negative Colorectal Cancer Patients.

Rosenberg R., Hoos A., Mueller J., **Baier P.**, Stricker D., Werner M., Nekarda H., Siewert J.R.

Journal of Clinical Oncology, Vol 20, No. 4 (February 15), 2002: pp 1049-1055

10 ANHANG

10.1 Laborprotokoll

10.1.1 Färbemethoden

Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung):

- Gefrierschnitte lufttrocknen 4 -24 h
- in Formalin 1 min
- Spülen mit Aqua dest.
- mit Hämalaun färben 5 min
- mit fließendem Leitungswasser bläuen 5-10 min
- Eosin (0,1%) gegenfärben 1 min
- Spülen mit Aqua dest.
- Dehydrieren in aufsteigender Propanol-Reihe (70 % - 96% - 100 %)
- In Rotihistol (Roth 6640) (Xylolersatz) fixieren 5 min
- Eindecken mit Eukitt

Ansatz für Hämalaun nach Mayer:

- 1 g Hämatoxylin (Merck 4302)
- 0,2 g $NaJO_3$(Merck 6525)
- 50 g Kalialaun (Merck 1047) in 1000 ml Aqua dest. lösen, über Nacht
  - rühren lassen, dann
- 50 g Chloralhydrat (Merck 2425) und
- 1 g Zitronensäure (Merck 244) zugeben (1 Woche im Dunkeln reifen
  - lassen)

Ansatz für Eosin:

- 1 g Eosin G (Merck 15935) in
- 1000 ml Aqua dest. lösen
- Tropfen 100%ige Essigsäure zugeben (Aufbewahrung im Kühlschrank)

Immunhistologische Färbung mit APAAP-Komplex:

APAAP-Komplex-Färbung:

- Gefrierschnitte lufttrocknen 4-24 h
- in Aceton (Merck 14)fixieren 30 min
- in Chloroform (Merck 2445) fixieren 30 min
- Inkubation mit 1. Ak: 30 min

  200 µl spezifischer Ak , verdünnt

  200 µl PBS (Merck 295868) für Negativkontrollen
- mit Spülpuffer 3 mal spülen
- in Formalin (4%) fixieren 1 min
- mit Spülpuffer 3 mal spülen
- Inkubation mit 2. Ak 30 min

  200 µl rabbit-anti-mouse Immunglobulin (ram-Ig) (Dako Z 259), verdünnt
- mit Spülpuffer 3 mal spülen
- Inkubation mit 3. Ak 30 min

  200 µl APAAP-Komplex, verdünnt (s.u.)
- mit Spülpuffer 3 mal spülen
- Wiederholung Schritte 8-12 10 min
- Entwicklungspuffer (auf d. Schüttler) 30 min
- mit Spülpuffer 3 mal spülen
- mit Hämalaun gegenfärben 5 min
- im Spülpuffer bläuen 1 min
- Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine (Merck 9242)

Verdünnung der Antikörper mit RPMI:

1. Ak: CEA –Ak wie 1:5
   Ck 20-Ak wie 1:100
   Ep 4 –Ak wie 1:80
2. Ak: ram-Ig wie 1:20 (vorher RPMI 8:1 mit inaktiviertem Humanserum (30 min bei 56°C) gemischt)
3. Ak: APAAP-Komplex wie 1:160

Ansatz für RPMI:

- 50 ml RPMI (Seromed 1640)
- 450 ml Aqua dest
- 50 ml Rinderserum (Flow: 29-101-54), inaktiviert (30 min bei 56 °C)
- 0,5 g Natriumazid (Merck 6688)
- pH 7,4 - 7.6 einstellen (Aufbewahrung im Kühlschrank, max. 3 Tage)

Ansatz für Spülpuffer:

- 4,5 g Tris-Base (Merck 8382)
- 34,25 g Tris-HCl (Sigma T 3253)
- 43,9 g NaCl (Merck 6404)in
- 5000 ml Aqua dest. lösen
- pH 7,4 – 7,6 einstellen. (mit Tris-HCl / Tris-Base)

Ansatz für 250 ml Entwicklungspuffer:

- 175 ml EWP:
    - 8,7 g NaCl
    - 1,5 g Tris-HCl
    - 4,9 g Tris-Base in
    - 1000 ml Aqua dest. gelöst
- 62,5 ml Propandiol:
    - 21 g Propandiol (Merck 801464) in
    - 1000 ml Aqua dest. gelöst
    - Aufbewahrung im Kühlschrank

- beide Lösungen zusammengeben und auf pH 9,75 einstellen

- 100 mg Levamisol (Sigma L-9756)

- 50 mg Natriumnitrit (Merck 6549) in
- 1250 µl Aqua dest. mit
- 500 µl Neufuchsin (s.u.) genau 1 min reagieren lassen

- 125 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat (Sigma N 2250) in
- 1500 µl DMF (Dimethylformamid, Merck 3034)

- alle drei Substanzen nacheinander dazugeben
- ph 8,8 einstellen
- Puffer filtrieren

Ansatz für Neufuchsin:

- 5 g Neufuchsin (Merck 4040) in
- 100 ml 2 N HCl lösen
- Aufbewahrung dunkel im Kühlschrank

10.1.2 RNA – Extraktion

Vorbereitung der Reagenzien:

- 450 µl ß-Mercapto-Ethanol (Sigma M-6250) → RLT-Puffer (Abzug!; 1Monat haltbar)
- 44 ml Ethanol 100 % → RPE-Puffer
- RNA-Proben nicht auftauen lassen

Zugabe der Lösungen jeweils pro tube:

- 600 µl RLT-Puffer
- Zentrifugieren (im QIA-Shredder) 2 min / 14 000 rpm
- Zentrifugieren ohne Filter 3 min / 14 000 rpm
- Überstand umpipettieren, Bodensatz verwerfen
- 600 µl Ethanol 70%, homogenisieren
- Zentrifugieren (2 x 600 µl der Probe),
- flow-through verwerfen 15 sec /10000 rpm
- 700 µl RW1-Puffer
- Zentrifugieren, in neues Röhrchen umsetzen 15 sec /10000 rpm
- 500 µl RPE-Puffer

- Zentrifugieren, flow-through verwerfen 15 sec / 10 000 rpm
- 500 µl RPE-Puffer
- Zentrifugieren, flow-through verwerfen 2 min / 14 000 rpm
- Filter in Eppendorff-Röhrchen umsetzen
- 50 µl steriles Wasser
- Zentrifugieren 1 min / 10 000 rpm
- Wiederholung der letzten 2 Schritte

Auftrennen der extrahierten RNA auf 2%igem Agarosegel (jeweils 2 µl)

10.1.3 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts

10 µl RNA in 990 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat =RNAse-freies Wasser) mit DEPC-Wasser als Leerwert. Von jedem Lymphknoten wurden ca. **40-60 µg totalRNA** gewonnen.

Formel: $40 \cdot a \cdot c = x$ µg RNA / ml mit $a = \lambda(1) - \lambda(2)$; c= 100

$400\ a = x$ µg RNA/ tube (Verdünnung in der Küvette)

Ansatz für DEPC-Wasser (0,1%):

- 100 µl Stammlösung (Sigma, D-5758)
- 99,9 ml Wasser
- Inkubation 12 h, 37 °C
- Autoklavieren oder 15 min auf 100 °C erhitzen

10.1.4 RT – PCR

Ansatz für Master-Mix I (MM I):

- 14 µl steriles Wasser · y
- 10 µl RT-PCR-Puffer · y
- 1 µl Enzym-Mix · y

Ansatz für Master-Mix II (MM II):

- 4 µl dNTP (Desoxy-Nukleosid-Triphosphate) · y
- 2,5 µl DTT-Puffer · y
- 1 µl RNAse-Inhibitor · y

mit y = z (n+2)

n = Anzahl der tubes

z = Anzahl der Primer

Beispiel-Protokoll (Angaben in µl):

3 RNA-Proben 1-3, Positiv- und Negativkontrolle, ein Primerpaar (n= 5, z= 2):

	Probe 1	**Probe 2**	**Probe 3**	**pos-Kontr.**	**neg-Kontr.**
MM I	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
RNA	5	5	5	1	0
Primer 1	1	1	1	1	1
Primer 2	1	1	1	1	1
MM 2	25	25	25	25	25
steriles Wasser	10,5	10,5	10,5	14,5	15,5
Mineralöl	30	30	30	30	30

Da immer Aliquote von 2,0 µg RNA eingesetzt werden, müssen die Gesamtvolumina mit H_2O ausgeglichen werden.

Primer-Sequenzen:

- **CEA:**

Primer A1: 5´- TCT GGA ACT TCT CCT GGT CTC TCA GCT GG-3´

Primer A2: 5´-TGT AGC TGT TGC AAA TGC TTT AAG GAA GAA GC-3´

- **Ck 20:**

Primer C1: 5`- CGT CTA ACA GTG GAA GCT GAT CTC-3´

Primer C2: 5`-TCG GGC GTT CCA TGT TAC TC-3`

- **ß-MG:**

Primer M1: 5´-CCT GAA TTG CTA TGT GTC TGG GTT TCA TCC A-3´

Primer M2:5`-GGA GCA ACC TGC TCA GAT ACA TCA AAC ATG G-3

Cycler-Programme (Landgraf Varius-V-Thermocycler):

CEA-RT-PCR:

- Reverse Transkription 50°C 30 min
- Strangdenaturierung 94°C 2 min
- 10 Zyklen Denaturierung 94°C 30 sec
- Annealing 69°C 30 sec
- Elongation 68°C 45 sec
  - → 20 Zyklen
- Elongation 68°C 5 min.

Ck 20-RT-PCR:

- Reverse Transkription 50°C 30 min
- Strangdenaturierung 93°C 5 min
- 10 Zyklen Denaturierung 94°C 1 sec
- Annealing 63°C 20 sec
- Elongation 72°C 10 sec
- → 35 Zyklen
  - o mit Prolongation pro Zyklus 72°C 5 sec
- Elongation 72°C 5 min

10.1.5 Elektrophorese der RT-PCR-Produkte

- Marker: 2 µl DNA-Marker VIII + 2 µl Gel Loading Solution (Sigma G-2526)
- Proben: 5 µl DNA + 2 µl Gel Loading Solution (Sigma G-2526)

Laufzeit: 2-3 h/ 100 Volt / 160 Milliampère

Ansatz für Ethidiumbromid-Agarose-Gels (2%ig):

- 6 g Agarose (Roche, 1816586)
- 300 ml TAE-Puffer (Sigma, T-9650) (10%ig: 100 ml TAE-Puffer 100%
- + 900 ml steriles Wasser)

11 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Patricia Maria Gloria Baier
Adresse	Thalkirchnerstr. 27, 80337 München
Geburtsdatum	16.01.1975
Geburtsort	Wangen im Allgäu
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung und Studium

1985-1994	Grundschule und Gymnasium (Lindau/Bodensee)
1995-1998	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1998-2001	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München

Ärztliche Prüfung am 16. November 2001 - Note: 2,0

Famulaturen

1998	Allgemein- und Unfallchirurgie, Lindau / Bodensee
1998	Innere Medizin (Gastroenterologie), Bolzano, Italien
1999	Gynäkologie und Geburtshilfe, Marseille, Frankreich
2000	Praxisfamulatur Orthopädie / Sportmedizin, München

Praktisches Jahr (2000/2001)

1. Tertial:	Sportorthopädie, TU München Orthopädie, TU München
2. Tertial:	Innere Medizin (Gastroenterologie), TU München Innere Medizin (Allg. Med. u. Hämatoonkologie), Marseille, Frankreich
3. Tertial:	Allgemeine und Viszeralchirurgie, Marseille, Frankreich

AiP (02/2002-07/2003)

Orthopädie und Sportorthopädie,

Krankenhaus München-Bogenhausen, München

Assistenzärztin (seit 08/2003)

Abteilung für Orthopädie, Clinique Générale, Annecy, Frankreich

Zusatzkurse im Rahmen der medizinischen Ausbildung:

- Sportorthopädie und Sportmedizin (Vorlesung mit Praxisteil)
- Gipskurs
- Spezialkurs für Ärzte: Arthroskopie des Schultergelenks

Berufsrelevante Erfahrungen

1994-1995	Praktikum: Tierärztliche Klinik für Pferde, Opfenbach/Lindau
1997	Praktikum: Springer in der Operationsabteilung, KKH Lindau
1997	Präparations-Assistentin, Institut für Anatomie, MLU Halle-Wittenberg
1999-2000	Praktikum: Chirurgische Intensivstation, Deutsches Herzzentrum München

Fremdsprachen

- Englisch (fließend in Wort und Schrift)
- Französisch (fließend in Wort und Schrift)
- Latein

München, 16.10.2003

12 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. med. H. Nekarda als Doktorvater für die Einführung in die Thematik, für Ratschläge und die abschliessende Korrektur. Auch danke ich Herrn Dr. med. R. Rosenberg, der mit der Betreuung beauftragt war. Für fachkundigen Rat in technischen Fragen danke ich vor allem Frau C. Marthen (MTA).

Außerdem danke ich Herrn Prof. univ. Dr. med. J.R. Siewert für seine Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter, meinem Bruder und besonders meinem Freund.

13 EHRENWORT

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Prognostische Bedeutung der
CEA- und Ck 20-m-RNA-Detektion mittels RT-PCR in
periturmoralen Lymphknoten von Patienten mit
nodal negativem kolorektalen Karzinom
im Stadium UICC I und II

in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. J. R. Siewert ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. an keinem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

München, den 16.10.2003

_____

Patricia Maria Gloria Baier