

Aus der Einrichtung für
Knochenmarktransplantation
im Transplantationszentrum
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. A. R. Zander

**Zytokeratin-20-Reverse-Transkriptase-
Polymerasekettenreaktion
zum Nachweis
disseminierter Tumorzellen beim
Mammakarzinom:
Ziele und Grenzen**

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Sandra Mumme
aus Hamburg
Hamburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1.Hypothese und Fragestellung.....	6
2.Einleitung.....	8
2.1.Klinischer Hintergrund: Hochdosischemotherapie beim Mammakarzinom mit autologer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation.....	8
2.1.1.Behandlungsergebnisse bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (Tumorstadium IV).....	10
2.1.2.Behandlungsergebnisse bei Hochrisiko-Mammakarzinompatientinnen (Tumorstadium II und III).....	13
2.2.Minimal Residual Disease.....	17
2.3.Autologe Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation.....	18
2.4.Aktuelle Diskussion: Bewertung unterschiedlicher Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und in mobilisierten Stammzellen. ...	22
2.4.1.Bedeutung disseminierter Tumorzellen.....	22
2.4.2.Gegenüberstellung der Nachweisverfahren der MRD hinsichtlich Sensitivität und Spezifität.....	28
2.4.2.1.Sensitivität.....	28
2.4.2.2.Spezifität.....	31
3.Material und Methoden.....	37
3.1.Material.....	37
3.1.1.Primer.....	37
3.1.2.Zytokine.....	37
3.1.3.Kits.....	40
3.1.4.Tumorzelllinien.....	41
3.1.5.Reagenzien und Chemikalien.....	42
3.1.6.Puffer, Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	42
3.1.7.Einwegmaterialien.....	43
3.1.8.Geräte.....	44
3.2.Methoden.....	46
3.2.1.Patientenproben: Knochenmark, mobilisierte Blutstammzellen und peripheres Blut.....	46
3.2.2.Gewinnung der mononukleären Zellfraktion.....	47
3.2.2.1.Ficoll-Gradienten-Separation.....	48
3.2.2.2.Erylyse.....	48
3.2.3.Tumorzelllinien und Verdünnungsreihen.....	49

3.2.4. Zytokin-Stimulation von Zelllinien und Patientenproben.....	51
3.2.5. Zytokeratin 20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion.....	55
3.2.5.1. RNA-Extraktion.....	56
3.2.5.1.1. Schutzmaßnahmen.....	56
3.2.5.1.2. Durchführung der RNA-Isolation.....	56
3.2.5.1.3. Bestimmung der Ausbeute.....	58
3.2.5.1.4. Reinheit und Qualität der isolierten RNA.....	59
3.2.5.2. Reverse Transkription.....	59
3.2.5.3. Polymerasekettenreaktion.....	61
3.2.5.4. Gel-Elektrophorese.....	66
3.2.6. Methoden zur Datenanalyse.....	67
4. Ergebnisse.....	68
4.1. Etablierung der CK20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion.....	68
4.1.1. Etablierung der RNA-Extraktion.....	68
4.1.2. Etablierung der RT-PCR.....	70
4.2. Sensitivität der CK20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion.....	72
4.3. Untersuchung von Knochenmark-, Stammzellapharese- und peripheren Blutproben von Mammakarzinompatientinnen sowie von einer Kontrollgruppe ohne Mammakarzinom mit Hilfe der CK20-RT-PCR.....	75
4.3.1. Mammakarzinompatientinnen.....	75
4.3.2. Kontrollkollektiv.....	78
4.3.3. Vergleich der Ergebnisse von Mammakarzinompatientinnen und Kontrollpersonen.....	80
4.3.4. Verfahren zur Separation der mononukleären Zellfraktion.....	81
4.4. Vergleich von Polymerasekettenreaktion und Immunzytologie.....	82
4.5. CK20-RT-PCR-Ergebnisse vor und nach Zytokin-Stimulation.....	83
4.5.1. Verschiedene Zelllinien.....	84
4.5.2. Patientenproben.....	85
5. Diskussion.....	90
6. Zusammenfassung.....	106
7. Literaturverzeichnis.....	109
8. Danksagung.....	130
9. Lebenslauf.....	132

Abkürzungen

aKMT	autologe Knochenmarktransplantation
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CFU	colony forming unit
CK	Zytokeratin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
EMA	epitheliales Membranantigen
flt3-Ligand	fms-like thyrosinekinase-3-ligand
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	granulocyt-colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyt-macrophage-colony stimulating factor
GvHD	graft versus host
GvL	graft versus leukemia
HDC	Hochdosischemotherapie
IA	inner antisense-Primer
IL	Interleukin
IMS	Immunomagnetische Separation
INF- γ	Interferon- γ
IS	inner sense-Primer
IZ	Immunzytologie
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LP	Leukapherese
MEM-Eagle	Minimum Essential Medium Eagle
MG	Mammaglobin
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MRD	Minimal Residual Disease
MNC	Mononukleäre Zellen
OA	outer antisense-Primer
OS	outer sense-Primer
PB	peripheres Blut
PBS	phosphate buffered saline
PBSZ	Periphere Blutstammzellen/ mobilisierte Blutstammzellen
PBSZT	(peripheres) Blutstammzelltransplantation
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSA	Prostata spezifisches Antigen
RNA	Ribonucleinacid
RT	Reverse Transkription
SCF	stem cell factor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPO	Thrombopoetin
ZK	Zellkultur
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1. Hypothese und Fragestellung

Bei der Therapie des Mammakarzinoms mit Hochdosischemotherapie (HDC) und autologer Progenitorzelltransplantation kommt es in stadienabhängiger Häufigkeit zur Reinfusion kontaminierender Tumorzellen mit dem Autotransplantat. Möglicherweise können diese reinfundierten, okkulten Malignomzellen zu einem Rezidiv der zu therapierenden Grunderkrankung führen.

Vor diesem Hintergrund ist es von entscheidender Bedeutung, die kontaminierenden Tumorzellen mit hoher Detektionsrate bereits vor Reinfusion im Autotransplantat zu erkennen, um entsprechende Maßnahmen, wie zum Beispiel das Tumorzell-Purging, zur Elimination bzw. Reduktion der malignen Zellen durchführen zu können und so die Gefahr eines Rezidivs zu verringern.

Der Nachweis solcher Mikrometastasen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen hat darüber hinaus auch prognostische Bedeutung, so dass ein sensitiver und spezifischer Nachweis dieser Tumorzellabsiedlungen wertvoll für die Beurteilung des Tumorstadiums und das daraus resultierende weitere therapeutische Vorgehen wäre.

Eine solche hochsensitive Nachweismethode der Minimal Residual Disease (MRD) stellt die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) dar. Um dieses Verfahren für die Detektion disseminierter Tumorzellen in der klinischen Routinediagnostik anwendbar zu machen, gilt es, die mRNA-Zielsequenz einer Struktur des Zytoskeletts zu finden, die spezifisch für die epitheliale Mammakarzinomzelle ist und nicht von hämatopoetischen Zellen transkribiert wird. Nur so kann neben der hohen Sensitivität auch eine hohe Spezifität des Nachweisverfahrens garantiert werden.

Es existiert eine zunehmende Anzahl von mRNA-Zielsequenzen, die zur Erkennung okkulten, epithelialer Tumorzellen in RT-PCR-Protokollen eingesetzt werden, wobei ursprünglich alle eine hohe Sensitivität und Spezifität versprachen. Verschiedene mit diesem Thema befasste Arbeitsgruppen kamen bezüglich der Spezifität einzelner mRNA-Zielsequenzen zu kontroversen Ergebnissen und zum jetzigen Zeitpunkt existiert noch keine hinreichende Erklärung dafür, wie diese unterschiedlichen Studienergebnisse zustande kommen.

Ähnliches gilt auch für das Zytokeratin 20, einem Bestandteil des Zytoskeletts, welches sich bislang als hochspezifischer Marker für epitheliale Tumoren des Gastrointestinaltraktes darstellte, jedoch kürzlich ebenfalls einen hohen Anteil falsch-

positiver Befunde in einer Kontrollgruppe zeigte. Vorwiegend waren es Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen innerhalb dieses Kontrollkollektivs, die falsch-positive PCR-Ergebnisse aufwiesen. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass bestimmte Zytokine, die in Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle spielen, für diese unspezifische Expression in hämatopoetischem Gewebe verantwortlich sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst untersucht werden, ob es möglich ist, die Zytokeratin 20-RT-PCR für den Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen so zu etablieren und zu optimieren, dass die maximal mögliche Sensitivität dieser Methode erreicht wird.

Im Folgenden soll die Spezifität der CK20-RT-PCR für den Nachweis von Mammakarzinomzellen sowie die Störanfälligkeit der Methode evaluiert werden. Die CK20-RT-PCR wurde bislang schon erfolgreich für den Nachweis von Tumorzellen gastrointestinalen Ursprungs eingesetzt. Es stellte sich in Einklang mit der Immunzytochemie eine überwiegend hohe Spezifität des Zytokeratins 20 für epitheliale Tumoren des Gastrointestinaltrakts dar. Für das Mammakarzinom zeigte sich dagegen mit der immunzytochemischen Nachweismethode eine überwiegende oder vollständige CK20-Negativität. Es soll nun untersucht werden, ob die CK20-RT-PCR-Methode, entgegen den Ergebnissen der Immunzytochemie, auch für das Mammakarzinom eine hohe Spezifität aufweist.

Schließlich soll der Frage nachgegangen werden, unter welchen Bedingungen es zu einer aberranten CK20-Expression in hämatopoetischen Zellen kommen kann. Ausgangspunkt hierfür sind die bereits erwähnten Befunde einer hohen Anzahl falsch-positiver PCR-Befunde in Proben von Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen. Diese lassen vermuten, dass es durch Einflussnahme verschiedener Zytokine, die in Entzündungsprozessen eine Rolle spielen, zu einer CK20-Expression in hämatopoetischen Zellen kommen könnte.

2. Einleitung

2.1. Klinischer Hintergrund: Hochdosischemotherapie beim Mammakarzinom mit autologer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation

Die Chemotherapie hat bei der Behandlung verschiedener maligner, hämatologischer Erkrankungen und solider Tumoren einen bedeutenden Stellenwert erlangt. Auch das Mammakarzinom gehört zu den chemotherapiesensiblen Tumoren, so dass durch die Einführung der systemischen, adjuvanten Chemotherapie in der Brustkrebstherapie bedeutende Fortschritte erzielt werden konnten (Harris et al. 1992). Durch den Einsatz der Chemotherapie in Kombination mit der Chirurgie und der Strahlentherapie konnten deutlich verbesserte Behandlungsergebnisse erreicht werden. Metaanalysen von prospektiven, randomisierten Studien zeigten, dass eine Behandlung mit adjuvanter Chemotherapie nach operativer Tumorresektion das relative Risiko einer Rezidivbildung verringern und die Gesamtüberlebenszeit einiger Patientensubgruppen verbessern kann (Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group 1992). Leider profitieren nicht alle Patientinnen mit Mammakarzinom von einer adjuvanten Chemotherapie. Es zeigte sich, dass der axilläre Lymphknotenstatus, der neben dem Zeitpunkt der Diagnosestellung, dem Tumorstadium und dem biologischen Verhalten des Malignoms zu den wichtigsten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms gehört, einen prognostisch limitierenden Faktor für die Wirksamkeit der adjuvanten Chemotherapie darstellt.

Gute Erfolge konnten mit dieser Therapieform insbesondere bei Patientinnen mit Befall von ein bis drei axillären Lymphknoten erzielt werden.

Unbefriedigende Ergebnisse der adjuvanten Chemotherapie ergaben sich dagegen bei so genannten Hochrisikopatienten mit ausgedehntem axillären Lymphknotenbefall von mehr als neun histologisch maligne veränderten Lymphknoten (Bonnadonna et al. 1995) oder fortgeschrittenem Primärtumor (Buzzoni et al. 1991). In einer Studie von Bonadonna et al. wurden nodal positive Mammakarzinompatientinnen mit einem alternierenden konventionellen Therapieregime behandelt. Eine Follow-up-Untersuchung nach im Median 19,4 Jahren zeigte bei allen Patientensubgruppen mit

positivem Lymphknotenstatus einen Benefit der adjuvanten Chemotherapie gegenüber der alleinigen radikalen Mastektomie, jedoch waren lediglich 28% der Patienten mit mehr als 9 positiven Lymphknoten rezidivfrei geblieben, die Gesamtüberlebensrate betrug 44% (Bonadonna et al. 1995).

Eine Stadieneinteilung des Mammakarzinoms ist daher für die Abwägung der geeigneten Therapiemodalität sowie auch als Vergleichsgrundlage bei wissenschaftlichen Fragestellungen unerlässlich. Diese erfolgt nach der TNM-Klassifikation.

Besonders hoch ist das Rezidivrisiko bei Patientinnen im Tumorstadium IV und mit inflammatorischem Mammakarzinom. Im Falle einer Metastasierung können mit der konventionellen Chemotherapie lediglich Vollremissionsraten von 20-25% erzielt werden. Die mittlere Überlebenszeit für diese Patientengruppe beträgt etwa ein bis drei Jahre (Eddy 1992, Ali et al. 2003).

Für das Mammakarzinom konnte eine positive Korrelation zwischen der Zytostatikadosis und der Ansprechrate gefunden werden (Wood et al. 1994, Bonadonna et al. 1981, Hryniuk et al. 1986, De Vita 1993). Die mögliche Dosissteigerung wird durch die Knochenmarkstoxizität der Zytostatika limitiert, da diese in zunehmendem Maße zur Myelosuppression mit konsekutiver Leuko- und Thromozytopenie führt. Dadurch bedingt nimmt auch das Infektions- und Blutungsrisiko zu.

Durch Einführung der Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer Progenitorzelltransplantation wird eine Behandlung mit deutlich höheren Zytostatikadosen ermöglicht. Auch durch die therapeutische Applikation von Wachstumsfaktoren lässt sich die Myelotoxizität der Zytostatika senken, so dass eine weitere Dosisescalation möglich wird (Bonnetterre et al. 1998, Levine et al. 1998, Wood et al. 1994). Da die Hochdosischemotherapie in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen bereits erfolgreich eingesetzt wird, hat man in dieser Methode auch für das Mammakarzinom einen viel versprechenden Therapieansatz gesehen. Für Patienten mit Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen mit unter konventioneller Therapie infauster Prognose wurden Heilungsraten von bis zu 50% beschrieben (Kessinger et al. 1991). Für einige seltene maligne Erkrankungen, wie Keimzelltumore und pädiatrische Sarkome, die atypischerweise im Erwachsenenalter auftreten, stellt die Hochdosischemotherapie in bestimmten Studien bereits den therapeutischen Standard dar (Rodenhuis et al. 1999).

Die Entnahme der hämatopoetischen Stammzellen erfolgt vor der

Hochdosischemotherapie, so dass die Knochenmarktoxizität nicht mehr dosislimitierend ist. Daher kann eine Zytostatikaapplikation in myeloablativer Dosierung durchgeführt werden, um so eine maximale tumortoxische Wirkung zu erzielen. Nach Elimination der zytotoxischen Substanzen aus der Blutbahn werden die Progenitorzellen autolog reinfundiert und führen so zu einer raschen und anhaltenden Rekonstitution des Knochenmarks mit Wiederherstellung einer effizienten Hämatopoese. Die Vorteile dieses Behandlungskonzepts werden allerdings dadurch getrübt, dass in der Phase der Myeloablation im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie eine erhöhte therapieassoziierte Morbidität und Mortalität besteht, insbesondere bedingt durch das erhöhte Infektions- und Blutungsrisiko aufgrund der ausgeprägten Leuko- und Thrombozytopenie.

Es stellt sich also die Frage, ob die Hochdosischemotherapie unter Berücksichtigung der durch die Myelotoxizität bedingten höheren Morbidität und Mortalität einen therapeutischen Vorteil für die Patientinnen bietet und wie sicher diese Behandlungsmethode überhaupt ist.

Frühe Studien zeigen für die Hochdosischemotherapie beim Mammakarzinom eine relativ hohe behandlungsbedingte Mortalität von 9% bis 22% (Dunphy et al. 1990, Jones et al. 1990, Williams et al. 1992). Allerdings waren viele dieser Studien an intensiv vorbehandelten Patientinnen mit therapierefraktärem Malignom und in schlechtem Allgemeinzustand durchgeführt worden. Bei Anwendung der Hochdosischemotherapie an weniger intensiv vorbehandelten Patientinnen und mit verbesserten Stammzell-Mobilisationstechniken durch Einsatz von Wachstumsfaktoren ließ sich die therapieassoziierte Mortalität bedeutend senken. Sie liegt nun im Allgemeinen unter 5% (Antman et al. 1992) und entspricht damit der behandlungsbedingten Mortalitätsrate der Standarddosistherapie.

2.1.1. Behandlungsergebnisse bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (Tumorstadium IV)

Die ersten Studien, die sich mit der Frage nach der therapeutischen Effizienz der HDC im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie beschäftigten, wurden in den achtziger Jahren als einmalige Hochdosischemotherapie mit einem oder mehreren Zytostatika an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom durchgeführt (Stewart

1982, Peters et al. 1986). Bei diesem Kollektiv konnten Ansprechraten von 44-80% und Vollremissionsraten von 15-25% erreicht werden, allerdings handelte es sich überwiegend um Patientinnen die der konventionellen Behandlung gegenüber therapierefraktär waren. Die Ansprechzeiten waren jedoch meist nur von kurzer Dauer und es kam rasch zum Auftreten von Rezidiven (Peters et al. 1986, Dunphy et al. 1989). In dem Versuch, die Behandlungsergebnisse zu verbessern, wurde eine Induktionschemotherapie in Standarddosierung der Konsolidierungstherapie in myeloablativer Dosis vorgeschaltet, um die Tumormasse schon vorher so weit wie möglich zu verkleinern, unter der Annahme, dass die Hochdosistherapie ein kleineres Tumolvolumen effizienter eradizieren könne. Die Ergebnisse unterschiedlicher Studien bezüglich dieser Therapieform an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom waren sehr widersprüchlich. Peters (1995) konnte für diese Patientengruppe nach Hochdosischemotherapie eine verlängerte Gesamtüberlebenszeit von bis zu acht Jahren nachweisen, außerdem zeigten sich in den Studienergebnissen anderer Arbeitsgruppen für diese Behandlungsform im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie beim metastasierten Mammakarzinom höhere Ansprechraten von 60-100% bei Vollremissionsraten von 60-80% (Jones et al 1990, Vaughan et al. 1994, Ayash et al. 1994). In einer Analyse verschiedener Studien von Eddy (1992) konnte dagegen für die intensivierete Chemotherapie beim metastasierten Mammakarzinom zwar ein höhere Ansprechrate jedoch keine verlängerte Gesamtüberlebenszeit gefunden werden (Eddy 1992).

Aufgrund der fehlenden Randomisierung und Selektion des Patientenkollektivs sowie des oftmals retrospektiven Designs der beschriebenen Studien, kann nicht zweifelsfrei auf eine Überlegenheit der Hochdosistherapie gegenüber der konventionellen Chemotherapie geschlossen werden. Es existieren zurzeit nur drei publizierte, prospektive, randomisierte Studien, die den Therapieerfolg der konventionellen Chemotherapie mit dem der Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom verglichen haben.

Die viel zitierte Studie von Bezwoda et al. (1995) kann inzwischen nicht mehr als Referenz für die Beurteilung von Hochdosistherapien herangezogen werden, da bei einer Überprüfung der Originaldaten signifikante Protokoll-Verletzungen festgestellt wurden. Die Studie ist somit als nicht valide anzusehen (Pressemitteilung der American Society for Clinical Oncology (ASCO) vom 04.02.2002). Bezwoda und Mitarbeiter

hatten bei der Behandlung von 45 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom für die Patienten im Hochdosisarm einen Vorteil in der Vollremissionsrate (51% versus 4%) und der Gesamtüberlebenszeit (90 Wochen versus 50 Wochen gegenüber den Patienten im Standarddosisarm gefunden. Die Repräsentativität dieser Studie war bereits zuvor angezweifelt worden aufgrund des relativ kleinen Patientenkollektivs und des als Standarddosistherapie verwendeten Regimes, das keinem konventionellen Therapieschema entspricht.

Es existiert eine weitere randomisierte Studie von Peters et al., die sich vor allem mit der Frage des optimalen Zeitpunkts für eine Hochdosischemotherapie befasst. In dieser Studie wurden 98 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, die auf eine Induktionschemotherapie in Standarddosierung eine komplette Remission erreicht hatten, in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe erhielt direkt im Anschluss an die Induktionschemotherapie eine Hochdosischemotherapie mit autologer Knochenmarktransplantation, die andere Gruppe wurde weiter beobachtet und erst im Falle eines Rezidivs mit dem Hochdosisregime therapiert (Peters et al. 1996). Es zeigte sich für die Gruppe mit der frühzeitigen Hochdosistherapie ein Vorteil im rezidivfreien Überleben im Vergleich zur Standarddosistherapie. Jedoch konnte eine längere Gesamtüberlebenszeit für die Patientinnen festgestellt werden, bei denen erst zu einem späteren Zeitpunkt eine intensivierete Chemotherapie durchgeführt wurde. Dieses Ergebnis legt nahe, dass ein optimales Timing der Hochdosistherapie für den Behandlungserfolg entscheidend ist. Um diesen Zeitpunkt festlegen zu können, werden jedoch noch weitere Studien erforderlich sein.

Eine dritte randomisierte Studie wurde im Jahr 2000 in den USA von Stadtmauer et al. an einem relativ großen Patientenkollektiv von 553 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom durchgeführt. Die Patientinnen, die nach einer Induktionschemotherapie eine Voll- oder Teilremission erreichten, wurden in einen Hochdosis-Arm mit Stammzellersatz bzw. in einen konventionellen Chemotherapie-Arm randomisiert. Nach einer medianen Nachuntersuchungszeit von 3 Jahren zeigte sich für die Hochdosischemotherapie kein signifikanter Vorteil hinsichtlich der Gesamt- oder rezidivfreien Überlebenszeit (Stadtmauer et al. 2000).

Somit lässt sich für die Hochdosischemotherapie mit autologem Stammzellersatz bei Mammakarzinompatientinnen im Tumorstadium IV noch keine endgültige Aussage darüber machen, ob sie der konventionellen Therapie in Hinsicht auf die rezidivfreie und die Gesamtüberlebenszeit überlegen ist. Nach Auswertung der erwähnten

randomisierten Studien scheint sich jedoch ein bescheidener Vorteil der Hochdosis- gegenüber der Standarddosischemotherapie hinsichtlich der rezidivfreien Überlebenszeit abzuzeichnen. Um herauszufinden, ob sich dieses Ergebnis verifizieren lässt, werden jedoch die Ergebnisse weiterer prospektiver Studien abzuwarten sein. Ob eine definitive Heilungschance für diese Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom besteht, ist somit zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Die zurzeit laufenden Studien lassen aufgrund der kurzen Beobachtungszeiten noch keine endgültige Aussage zu.

2.1.2. Behandlungsergebnisse bei Hochrisiko-Mammakarzinompatientinnen (Tumorstadium II und III)

Nachdem die ersten Erfahrungen beim metastasierten Mammakarzinom gesammelt worden waren, begann man die Hochdosischemotherapie mit autologer Progenitorzelltransplantation auch in früheren Tumorstadien einzusetzen, da man sich für diese Patientinnen einen besonderen Benefit erhoffte. Ein Review von Patientendaten der Autologous Blood and Marrow Registry im Zeitraum von 1991-1995 zeigte eine signifikante Zunahme des Einsatzes der Hochdosischemotherapie bei Hochrisiko-Patientinnen gegenüber Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (Antman et al. 1997).

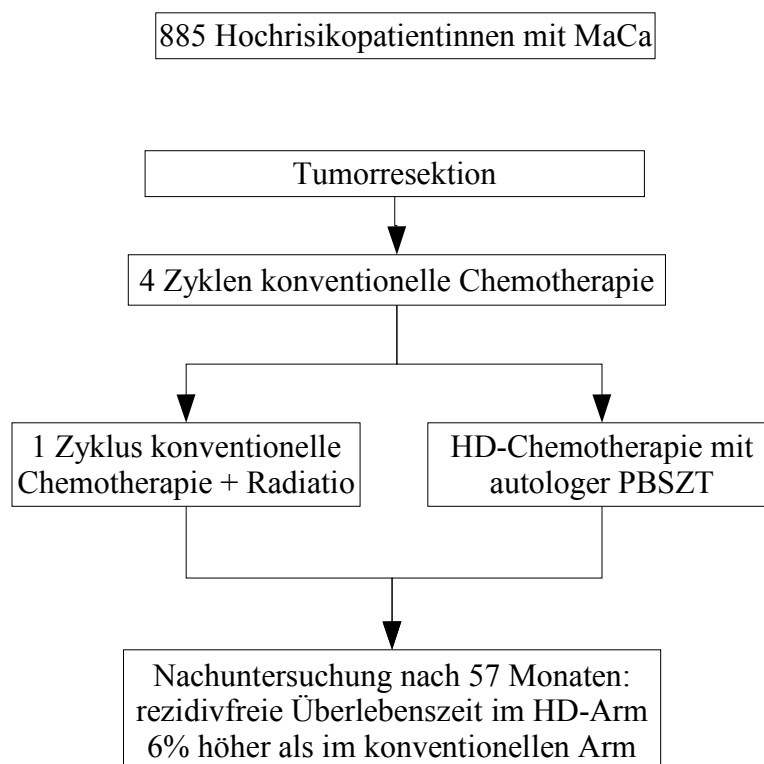
Es zeigte sich, dass vor allem so genannte Hochrisiko-Patientinnen mit einem extensiven Lymphknotenbefall von mehr als neun Lymphknoten im Tumorstadium II und III von einer Hochdosischemotherapie profitieren (Rowlings et al. 1997, Antman et al. 1997). Antman und Mitarbeiter behandelten Patientinnen im Tumorstadium II bis IV mit einer Hochdosischemotherapie, die Rezidivfreiheit nach drei Jahren lag bei Patientinnen im Stadium II und III bei 65% bzw. 60%, bei Patientinnen im Tumorstadium IV dagegen nur bei 7-32% (Antman et al. 1997). Die ersten Daten, in denen die Hochdosis-Therapie der Standarddosis-Therapie gegenübergestellt wird, stammen aus nicht randomisierten Studien und konnten für das Hochdosis-Regime bei Mammakarzinompatientinnen im Stadium II-III eine höhere Ansprechrate und Gesamtüberlebensrate im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie zeigen (Gradishar et al. 1996, Antman et al. 1997). In einer Studie von Gianni et al. (1997) waren bei einer Nachsorgeuntersuchung nach 78 Monaten 58% der mit HDC behandelten Patientinnen rezidivfrei geblieben, gegenüber nur 42% einer mit dem

konventionellen Regime behandelten historischen Kontrollgruppe. Peters und Mitarbeiter behandelten eine Gruppe von 85 Hochrisiko-Patientinnen mit Hochdosischemotherapie und autologer Stammzelltransplantation und fanden nach 5 Jahren Beobachtungszeit ein rezidivfreies Überleben von 71%. In einer historischen Studie der *Cancer and Leukemia Group B (CALGB)* von 1994 bis 1997 an 1516 Patientinnen mit nodal positivem Mammakarzinom, die mit konventionellen Therapieregimen in unterschiedlichen Dosisintensitäten behandelt worden waren, wurden dagegen nach drei Jahren Überlebensraten ohne Rezidiv von lediglich 28-48% gefunden (Peters et al. 1995). Auch diese Studie wurde allerdings kritisiert, da die Zytostatikadosis im konventionellen Arm sehr niedrig gewählt war (Wood et al. 1994). In einer nicht randomisierten, retrospektiven Studie von Berry et al. (2002) werden diese Ergebnisse der *CALGB* mit Daten der *Autologous Blood and Marrow Transplant Registry* verglichen, die 1188 Patientinnen mit Hochdosis-Regime und autologer Stammzelltransplantation behandelten. Die Auswertung der Ergebnisse dieser beiden großen, unabhängig voneinander durchgeführten Studien bestätigte ebenfalls den therapeutischen Vorteil des Hochdosisregimes bei Mammakarzinompatientinnen im Tumorstadium II und III. Es ergaben sich etwa gleiche Kurzzeitüberlebensraten im ersten Jahr nach Behandlung, jedoch geringfügig bessere 5-Jahres-Überlebensraten nach Hochdosischemotherapie im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie mit 23% versus 15%.

Eine prospektive, randomisierte Studie an einem größeren Kollektiv von Hochrisiko-Patientinnen mit Mammakarzinom wurde kürzlich von der niederländischen Forschergruppe um Rodenhuis veröffentlicht (Rodenhuis et al. 2003). In diesem Studiendesign wurden insgesamt 885 Hochrisiko-Patientinnen mit Mammakarzinom, die bereits einer Tumorsektion unterzogen worden waren, zunächst mit vier Zyklen einer konventionellen Chemotherapie behandelt. Anschließend wurde eine Randomisierung der 885 Patientinnen in zwei Gruppen vorgenommen. Die eine erhielt einen weiteren Zyklus einer konventionellen Chemotherapie (443 Patientinnen), bei der Vergleichsgruppe wurde eine Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation durchgeführt (442 Patientinnen). Bei einer Nachuntersuchung nach im Median 57 Monaten war die rezidivfreie Überlebenszeit im Hochdosis-Arm gegenüber dem konventionellen Arm mit einem 6%igen Vorteil länger, dieser Unterschied erreichte jedoch keine Signifikanz ($p=0,09$) (Abbildung 1). Die Gruppe der Hochrisiko-Patientinnen wurde nochmals nach der Ausdehnung des axillären

Lymphknotenbefalls bewertet. Dabei wurde zwischen Patientinnen mit 4 bis 9 und Patientinnen mit 10 oder mehr tumorpositiven, axillären Lymphknoten unterschieden. In der Patientengruppe mit mehr als 9 befallenen Lymphknoten konnte eine Verbesserung der Rate der rezidivfreien Überlebenszeit für die Hochdosischemotherapie gegenüber der konventionellen Therapie mit 61% versus 51% ($p=0,05$) nachgewiesen werden.

Abbildung 1: Prospektive Studie an Hochrisiko-Patientinnen mit Mammakarzinom der Netherlands Breast Cancer Group (Rodenhuis et al. 2003)



HD = Hochdosis

PBSZT = Blutstammzelltransplantation

Trotz dieser viel versprechenden Daten ist auch für die Gruppe der Hochrisiko-Patientinnen mit 10 oder mehr positiven axillären Lymphknoten der Vorteil der Hochdosischemotherapie gegenüber der konventionellen Chemotherapie hinsichtlich der Endpunkte rezidivfreies und Gesamtüberleben anhand der bisher vorliegenden Studienergebnisse nicht zweifelsfrei zu belegen. Die bisher vorliegenden Daten weisen auf einen bescheidenen Vorteil der Hochdosischemotherapie hinsichtlich der

rezidivfreien Überlebenszeit hin (Rodenhuis 2000 und 2001, Schrama et al. 1999, Schneeweiss et al. 2001). Mit der Hochdosischemotherapie sind jedoch auch für diese Patientengruppe nicht die durchbrechenden Erfolge erzielt worden, die man sich in den frühen neunziger Jahren erhofft hatte. Die Vergleichbarkeit nicht randomisierter Hochdosis-Protokolle mit konventionellen Therapieregimen ist aufgrund des selektionierten Patientenguts allerdings nur eingeschränkt möglich (Rahman et al. 1995).

Eine abschließende Bewertung muss daher von den Ergebnissen weiterer zurzeit laufender prospektiver Studien abhängig gemacht werden, die die Behandlungsergebnisse der Hochdosischemotherapie mit denen konventioneller Therapieregimes in dieser Patientengruppe vergleichen. Derartige Studien werden derzeit in den USA von der *CALGB* (Hurd et al. 1995) und in Europa von Zander et al. (1996 und 2004) und Gianni et al. (1997) durchgeführt.

Aufgrund dieser Erfolg versprechenden Behandlungsergebnisse bei Mammakarzinompatientinnen in den Tumorstadien II und III wurden neue Behandlungsstrategien mit kurativer Intention auch für das Tumorstadium IV entwickelt. Hierzu zählen die multizyklische und sequentielle HDC sowie die neoadjuvante Chemotherapie. Bei der multizyklischen HDC werden mehrere Zyklen einer Hochdosischemotherapie in höchstmöglicher Dosierung mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation hintereinander geschaltet (De Vita 1993, Ayash et al. 1994). Dieses Therapiekonzept basiert auf der Überlegung, dass aufgrund der langsamen Wachstumsgeschwindigkeit und Verdopplungszeit solider Tumoren multiple Chemotherapie-Zyklen erforderlich sind, um eine maximale Tumorzellelimination zu erreichen (De Vita 1993). Zusätzlich wird durch diese Methode eine weitere Dosisescalation erreicht. Auch die sequentielle HDC basiert auf dem Prinzip, den therapeutischen Nutzen durch die Durchführung mehrerer Zyklen einer HDC zu erhöhen. Im Gegensatz zur multizyklischen Chemotherapie wird dabei jedoch bei jedem Zyklus ein anderes Zytostatikum angewendet, welches keine Kreuzresistenz zu den vorhergehenden aufweisen darf. Dadurch lassen sich überlappende Toxizitäten vermeiden und es können somit höhere Dosisintensitäten erreicht werden. Auch bei dieser Methode wird nachfolgend eine autologe Progenitorzelltransplantation durchgeführt (Gianni et al. 1997). Im Rahmen der neoadjuvanten Chemotherapie wird präoperativ durch die Durchführung eines hochdosierten Zytostatikazyklus eine Verringerung der Tumorzellmasse und somit ein Downstaging angestrebt.

Inwieweit diese Behandlungsmethoden tatsächlich einen therapeutischen Vorteil aufweisen, muss anhand weiterer Studien erforscht werden. Eine relativ sichere Aussage kann man zumindest darüber machen, dass optimale Therapieergebnisse nur mit mehreren aufeinanderfolgenden HDC-Zyklen erzielt werden können.

2.2. Minimal Residual Disease

Maligne Tumoren können je nach Sensibilität durch chirurgische Intervention, Chemo- oder Strahlentherapie bzw. Kombinationen dieser Therapieformen behandelt werden. Bei einigen Patienten kommt es nach der Therapie zu einer Heilung, bei einem Großteil der Patienten muss jedoch mit einer Rezidiventwicklung gerechnet werden.

Bei Tumoren, die auf die gewählte Therapie nicht oder nur teilweise ansprechen, bleiben makroskopisch oder zumindest histologisch nachweisbare Tumoranteile vorhanden, man spricht von einer Teilremission. Bei diesen ist eine Rezidiventwicklung obligat. Es kommt aber auch bei Malignomen, bei denen eine Vollremission erreicht werden konnte, zum Auftreten von Rezidiven. Bei einer Vollremission sind mit den heute üblichen Nachsorgemethoden im Körper des Patienten, auch im Blut und Knochenmark, keine malignen Zellen mehr nachweisbar. Trotzdem kommt es oft zu Rezidiven.

Nach dem heutigen Stand der Forschung scheint die Rezidivbildung von im Knochenmark persistierenden, okkulten, malignen Zellen oder von bei autologer Transplantation akzidentiell reinfundierten, malignen Zellen auszugehen. Man bezeichnet das Auftreten dieser disseminierten Tumorzellen als „Minimal Residual Disease (MRD)“, also als „Minimale Resterkrankung“.

Die MRD bei hämatologischen Neoplasien unterscheidet sich grundsätzlich von der epithelialer Tumoren, da sie sich im angestammten Kompartiment der Tumorzellen abspielt, wohingegen epitheliale Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut ortsfremd sind und somit ungewohnten Bedingungen unterliegen. Zudem finden sich bei den soliden Tumoren keine pathognomonischen, genetischen Aberrationen, die sich

zum Nachweis der MRD eignen, wie z.B. das Philadelphia-Chromosom bei der CML. Daher weicht man zum Nachweis der MRD bei soliden Tumoren auf epithelspezifische Marker aus, die zwar als gewebespezifisch angesehen werden, jedoch nicht tumorspezifisch sind.

2.3. Autologe Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation

Der erste Versuch einer Knochenmarktransplantation als Therapiemöglichkeit für Knochenmarkstammzellerkrankungen wurde 1939 zur Behandlung einer aplastischen Anämie unternommen (Osgood et al. 1939). Klinische Erfolge auf diesem Gebiet konnten jedoch erstmalig 1968 nach Entdeckung der Bedeutung der Histokompatibilitätsantigene durch Bach und Amos verzeichnet werden (Bortin et al. 1994).

Wissenschaftliche Belege dafür, dass hämatopoetische Stammzellen auch im peripheren Blut existieren, wurden in den siebziger Jahren mittels in vitro-Studien an peripheren Blutzellen erbracht, die die Fähigkeit besitzen, so genannte „Kolonie formende Einheiten“ auszubilden (Mc Credie et al. 1971, Richman et al. 1978). Erste klinische Anwendung fand die periphere Stammzelltransplantation 1978 in der Therapie von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (Goldman et al. 1978), die Mobilisation von Vorläuferzellen in das periphere Blut durch vorangehende Chemotherapie wird seit Mitte der achtziger Jahre durchgeführt (Korbling et al. 1986).

Die transplantierten Vorläuferzellen können also aus zwei verschiedenen Quellen gewonnen werden, dem Knochenmark und dem peripheren Blut. Ursprünglich wurde ausschließlich Knochenmark zur Transplantation verwendet, da es physiologischerweise einen hohen Anteil an Vorläuferzellen aufweist (Thomas et al. 1975). Seit einiger Zeit werden jedoch in zunehmendem Maße mobilisierte Stammzellen aus dem peripheren Blut zur Transplantation benutzt.

Bei der autologen Knochenmarktransplantation erfolgt die Entnahme des Knochenmarks durch wiederholte Beckenkammpunktionen in Spinal- oder Allgemeinanästhesie. Das gesamte Verfahren kann in etwa einer Stunde durchgeführt werden. Insgesamt wird eine Menge von ca. 750 ml Knochenmark entnommen. Anschließend erfolgt durch eine Dichtezentrifugation oder Lyse der Erythrozyten die

Gewinnung der mononukleären Zellfraktion, die dann bis zur Reinfusion kryokonserviert wird.

Die Stammzellgewinnung bei der autologen Blutstammzelltransplantation kann ambulant durchgeführt werden, sie erfolgt meist in einer Sitzung oder aber alle 4 Wochen nach jedem Chemotherapiezyklus. Dabei werden die Vorläuferzellen durch subkutane Applikation des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF (6-24 µg/kg/d über 4-5 Tage) gegebenenfalls in Kombination mit einer konventionellen Chemotherapie in das periphere Blut mobilisiert (Elias et al. 1992, Krüger et al. 1999 a, Gratwohl 1996). Dort wird mit Hilfe eines Zellseparators eine Leukozytenapherese durchgeführt, wodurch die mononukleäre Zellfraktion des Bluts weitgehend von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten abgetrennt wird. Eine solche Leukapherese ist wiederholt durchführbar, so dass auch größere Zellmengen relativ leicht gewonnen werden können. Für eine Transplantation nach myeloablativer Chemotherapie sind etwa ein bis zwei Leukapheresen notwendig. Auch die so gewonnenen Stammzellen können bis zur Reimplantation durch Kryokonservierung über einen längeren Zeitraum ex vivo erhalten werden.

Nach der Stammzellentnahme kann die Hochdosischemotherapie erfolgen, die zur Myeloablation führt. Nach Elimination der zytotoxischen Substanzen aus dem Organismus werden die Stammzellen reinfundiert. Es ist möglich, die absolute Anzahl der zu reinfundierenden Zellen zu verringern, indem man durch immunomagnetische Anreicherung die so genannten CD34-positiven Zellen selektioniert. Diese Zellen, die das CD34-Antigen auf ihrer Oberfläche tragen, entsprechen den hämatopoetischen Progenitorzellen, so dass es ausreicht, diese Zellfraktion selektiv zu reinfundieren (Brugger et al. 1993). Für eine Transplantation nach Myeloablation sind etwa $2,5\text{-}4,85 \cdot 10^8$ mononukleäre Zellen (Williams et al. 1990, Kiesel et al. 1989) oder entsprechend $2 \cdot 10^6$ CD34-positiv Zellen pro Kilogramm Körpergewicht notwendig (Gratwohl, A. 1996, Bender et al. 1992). Die Stammzellen gelangen mit der Blutzirkulation in die Sinus des Knochenmarks, binden dort an spezifische Rezeptoren endothelialer Zellmembranen und nehmen ihre Funktion als Blut bildendes Organ wieder auf. Da sie pluripotent sind, d.h. sich in die unterschiedlichen hämatopoetischen Zelllinien differenzieren können, kommt es zu einer raschen Rekonstitution des gesamten Blut bildenden Systems (Engraftment).

Inzwischen findet die autologe Blutstammzelltransplantation (aPBSZT) bereits häufiger klinische Anwendung als die autologe Knochenmarktransplantation (aKMT). Die

Möglichkeit, die Anzahl der Progenitorzellen durch Mobilisationstechniken zu vervielfachen, sowie die einfachere Entnahmemöglichkeit der Zellen ohne Notwendigkeit einer Allgemeinanästhesie, haben die periphere Blutstammzelltransplantation zu einer attraktiven Alternative gemacht. Außerdem ging man aufgrund der Ergebnisse einiger Arbeitsgruppen eine Zeit lang von einer geringeren Tumorzellkontamination der autologen Leukaphereseprodukte im Vergleich zum Knochenmark aus (Sharp et al. 1991 und 1993). Des Weiteren zeigte sich in einer Studie ein rascherer Wiederaufbau von funktionstüchtigem Knochenmark nach autologer Stammzelltransplantation als nach KMT (Juttner et al. 1988).

In gewissen klinischen Situationen ist jedoch eine schnelle Stammzellgewinnung erforderlich, so dass in diesen Fällen das Knochenmark zur Gewinnung des Autografts bevorzugt wird. Auch bei extrem schlechten Venenverhältnissen kann der KMT der Vorzug gegeben werden. Zudem wird die geringere Tumorzellkontamination der Leukaphereseprodukte von einigen Studien bereits wieder angezweifelt. Brugger et al. (1994) nehmen aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse sogar an, dass es durch die Stammzellmobilisation mit Hilfe von Chemotherapie und Wachstumsfaktoren zur gleichzeitigen Mobilisation von Tumorzellen kommt. So konnten bei Mammakarzinompatientinnen, die zuvor immunhistochemisch keine zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut aufwiesen, nach Stammzellmobilisation mittels Chemotherapie und G-CSF in 21% zirkulierende Tumorzellen im Blut nachgewiesen werden. Bei Patientinnen im Stadium IV waren es sogar 100% (Brugger et al. 1994). Zu übereinstimmenden Ergebnissen kommen auch Kvalheim und Mitarbeiter, die ebenfalls bei Patientinnen im Tumorstadium II eine simultane Mobilisation von Tumorzellen mit den Stammzellen nach Chemotherapie und G-CSF-Gabe beobachteten (Kvalheim et al. 1996b). In anderen Studien war diese Co-Mobilisation dann zwar nicht reproduzierbar (Passos-Coelho et al. 1995), jedoch drängt sich die Frage auf, ob das Ausmaß der Tumorzellkontamination durch autologe Progenitorzelltransplantation nicht bislang unterschätzt wurde.

Die Zahl der Knochenmark- und peripheren Stammzelltransplantationen als kurativer Behandlungsansatz sowohl für hämatologische und lymphatische Systemerkrankungen als auch für bestimmte solide Tumorerkrankungen, wie zum Beispiel das Mammakarzinom, hat in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen.

Eine weitere Quelle zur Gewinnung hämatopoetischer Progenitorzellen stellt das Nabelschnurblut dar. Auch die so gewonnenen Zellen können zur Transplantation

eingesetzt werden. Dieses gewinnt als Quelle peripherer Stammzellen zunehmend an Bedeutung, da es eine genügend große Anzahl hämatopoetischer Vorläuferzellen mit besonderen proliferativen Eigenschaften enthält, die mit einfachen Methoden zu gewinnen sind. Außerdem gibt es ein quasi unbegrenztes Spenderkollektiv und zudem besteht die Möglichkeit der Therapie mit autologen Stammzellen, die bereits bei Geburt kryokonserviert wurden. Nabelschnurblutbanken mit HLA-typisierten Stammzellen befinden sich gegenwärtig als Ergänzung zu den Knochenmarkspenderdateien im Aufbau (Gratwohl 1996).

Man unterscheidet die allogene und autologe Transplantation, die sich in der Verteilung ihrer Indikationen und ihres Spektrums an Nebenwirkungen unterscheiden. Die allogene Transplantation wird vor allem bei Patienten mit Leukämie, aplastischer Anämie und kombinierten Immundefekten durchgeführt. Die Hochdosischemotherapie mit autologem Progenitorzellersatz wurde zunächst im Wesentlichen beim rezidivierenden Hodgkin-Lymphom, dem therapierefraktären niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphom und der akuten myeloischen Leukämie durchgeführt. Derzeit werden auch hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome und solide epitheliale Tumoren (v.a. das Mamma-, Ovarial- und Hodenkarzinom sowie das Neuroblastom) mit dieser Methode behandelt (Kessinger 1993, Kessinger et al. 1991, Droz et al. 1993, Gorin et al. 1995, Ueno et al. 1998, Peris et al. 1996, Salzman et al. 1997). Die Anwendung für die chronisch myeloische und chronisch lymphatische Leukämie sowie das Multiple Myelom befindet sich derzeit noch im experimentellen Stadium (Pigneux et al. 1999, Carella et al. 1999, Reiffers et al. 1991, Khouri et al. 1998, Femand et al. 1998, Dreger et al. 2000, Goldschmidt et al. 2000).

Bei der allogenen Transplantation stammen die Vorläuferzellen von einem gesunden, HLA-kompatiblen Spender, häufig einem Familienmitglied oder auch einem freiwilligen Spender). Das primäre Ziel liegt im Ersatz eines defekten Knochenmarkes. Die schwerwiegendsten Nebenwirkungen bestehen bei der allogenen Transplantation in der Graft-versus-host-Krankheit und der Gefahr schwerer Infektionen durch die notwendige Immunsuppression. Eine erwünschte Wirkung bei der allogenen Transplantation stellt bei malignen Erkrankungen dagegen der Graft-versus-leukemia-Effekt dar, hier kommt es zu einer immunologischen Reaktion zwischen den T-Lymphozyten des Spenders und den leukämischen Zellen des Empfängers, die hierbei zerstört werden (Giralt et al. 1997 a und b, Champlin 1995).

Das Hauptproblem bei der autologen Transplantation stellt dagegen die

Tumorzellkontamination des Autografts dar, die, wie bereits erwähnt, möglicherweise die Gefahr einer Rezidivbildung birgt.

Die Kontamination des Transplantates mit okkulten Tumorzellen wird mit verschiedenen Methoden zu minimieren versucht. Zum einen geht man davon aus, dass bereits durch die der Leukapherese häufig vorangehende konventionelle Chemotherapie eine weitgehende Elimination der Tumorzellen erreicht wird, da diese eine höhere Chemosensibilität aufweisen als die hämatopoetischen Zellen. Daher kommt es nach Abschluss des Chemotherapie-Zyklus zu einer rascheren Erholung der Blut bildenden Zellen und daher zur Ernte eines Autografts mit einem minimierten Tumorzellgehalt (Kessinger 1993). Die Induktionschemotherapie erfüllt somit zwei Aufgaben: Zum einen dient sie der weitgehenden Elimination der Tumorzellen aus dem Autotransplantat, zum anderen führt sie zur Mobilisation von Progenitorzellen in das periphere Blut. Andere Methoden, die eine Eliminierung oder zumindest Verringerung der Tumorzellkontamination des Autografts zum Ziel haben, setzen beim bereits entnommenen Knochenmark oder Leukaphereseprodukt an. Etablierte Methoden sind hier das nachfolgend noch genauer beschriebene Tumorzell-Purging und die Bestrahlung des Autotransplantates vor der Reinfusion.

2.4. Aktuelle Diskussion: Bewertung unterschiedlicher Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und in mobilisierten Stammzellen

2.4.1. Bedeutung disseminierter Tumorzellen

Das Mammakarzinom ist in Europa die häufigste Krebserkrankung der Frau (Babayan et al. 1993) und wird heute als Erkrankung angesehen, die frühzeitig von einem lokalen Tumorbefund in eine systemische Erkrankung konvertiert. Es findet eine frühzeitige Disseminierung von Tumorzellen bevorzugt in das Knochenmark statt, die als eine der Hauptursachen für Rezidiverkrankungen bei Tumorpatienten nach lokoregionärer Therapie (Chirurgische Therapieverfahren, Radiatio) diskutiert wird. Im Gegensatz zur

Organmetastasenbildung, bei der es sich um eine herdförmige Form handelt, ist die Metastasierung ins Knochenmark vorwiegend diffus. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind in stadienabhängiger Ausprägung in 11-87% der Fälle disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisbar (Tabelle 1).

Es liegen Ergebnisse vor, die eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Mikrometastasierung ins Knochenmark und dem Stadium der Erkrankung beschreiben (Fields et al. 1996). Bei T2-Tumoren nach der TNM-Klassifikation sind in 52%, bei T3-Tumoren in 57% und bei T4-Tumoren in 82% der Fälle zum Zeitpunkt nach Induktionschemotherapie Mikrometastasen im Knochenmark festgestellt worden. Über die Bedeutung dieser disseminierten Tumorzellen ist man sich bisher noch nicht ganz im Klaren. Es wurde jedoch festgestellt, dass es nicht immer zur Ausbildung von soliden Fernmetastasen kommen muss, wenn eine Mikrometastasierung in das Knochenmark vorliegt. Zusätzlich zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass sich die Anzahl der abgesiedelten Tumorzellen nach Entfernung des Primärtumors verringert (Westerhausen 1995).

Das Auftreten solcher disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wird von vielen Autoren als unabhängiger Prognosefaktor für die rezidivfreie Überlebenszeit und das Gesamtüberleben beschrieben. In mehreren Follow-up-Studien an relativ großen Patientenkollektiven zeigte sich ein signifikant verkürztes rezidivfreies Intervall sowie eine verkürzte Gesamtüberlebenszeit bei Patientinnen mit positivem Knochenmarkbefund (Mansi et al. 1992, Harbeck et al. 1994, Schlimok et al. 1991, Fields et al. 1996, Vredenburg et al. 1997). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass es bei einer hohen Anzahl von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark häufiger zu einem frühzeitigen Rückfall kommt (Cote et al. 1991).

Diel und Mitarbeiter (1991) konnten eine signifikante Korrelation zwischen einer Mikrometastasierung ins Knochenmark und der Tumorgröße, dem Lymphknotenstatus sowie dem histologischen Tumorgrading aufzeigen.

Bislang wurde angenommen, dass Knochenmark in größerem Ausmaß mit Tumorzellen kontaminiert sei als Blutstammzellprodukte (Ross et al. 1993). Inzwischen existieren jedoch diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse (Brugger et al. 1994), so dass die Annahme einer höheren Tumorzellkontamination des Knochenmarks bereits wieder in Frage gestellt werden muss (siehe auch Kapitel 1.3, Seite 14). Das Ausmaß der Tumorzellkontamination in den verschiedenen Blutzellkompartimenten war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung (Tabelle 1).

Tabelle 1: Häufigkeit, mit der kontaminierende Tumorzellen in Knochenmark (KM), mobilisierten Blutstammzellen (PBSZ) und peripherem Blut (PB) von Mammakarzinompatientinnen durch verschiedene Forschergruppen nachgewiesen werden konnten.

<i>Literatur-Referenz</i>	<i>KM</i>	<i>PBSZ</i>	<i>PB</i>	<i>Nachweis- methode</i>	<i>Tumor- stadium</i>
Kasimir-Bauer et al. 2001	34%			IZ+IMS	I-IV
Krüger et al. 1999 b		55%		IC + PCR	II-III
Krüger et al. 1999 a	48-87%			PCR	II-IV
Wasserman et al. 1999			59%	PCR	I-II
Oruzio et al. 1997	20-45%			IC + PCR	I-IV
Vredenburgh et al. 1997	36%	4%		IZ	II-III
Wulf et al. 1997	15-26%		3-29%	PCR+IZ	I-IV
Schulze et al. 1997	47%	37%		IZ	II-III
Hempel et al. 1996		100%		IZ nach Anreich	II-IV
Fields et al. 1996	52-82%			PCR	II-IV
Moscinski et al. 1996	60%			PCR	II-III
Passos-Coelho et al. 1996	11%	8%	3%	IZ+ZK	III-IV
Kvalheim et al. 1996	37%	25%	14%	IZ	II
Franklin et al. 1996	30%	17%		IZ	II-IV
Krüger et al. 1996 b	58%		54%	PCR	I-IV
Brugger et al. 1994	56%	78%	22%	IZ	IV
Shpall et al. 1994	36%	17%		IZ	II-IV
Ross et al. 1993	62%	10%		IZ+ZK	II-IV
Sharp et al. 1992	46%	19%		ZK	IV
Diel et al. 1990	32%			IZ	II-IV

- IZ = Immunzytologie
 PCR = Polymerasekettenreaktion
 ZK = Zellkultur
 IMS = Immunomagnetische Separation

Zurzeit ist noch nicht vollständig geklärt, inwieweit mikrometastatische, kontaminierende Tumorzellen bei Reinfusion im Rahmen einer autologen Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation zu einem Tumorrezidiv führen können. Zumindest in vitro (Joshi et al. 1990) und in Tierversuchen (Joshi et al. 1991)

konnte für mikrometastatische Zellen eine Vermehrungstendenz unter geeigneten Bedingungen nachgewiesen werden. Ob und in welchem Ausmaß diese Tumorzellen im menschlichen Körper jedoch ein metastatisches Potential besitzen, ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung. Eine Möglichkeit, das Verhalten kontaminierender Tumorzellen nach Reinfusion genauer zu betrachten, sind die Genmarkierungsexperimente, in denen die Tumorzellen mit retroviralen Vektoren markiert werden. Studien an Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (Deisseroth et al. 1994) und akuter myeloischer Leukämie (Brenner et al. 1993) lieferten erste Hinweise darauf, dass reinfundierte Tumorzellen zur Rezidivbildung beitragen können. Ob die mikrometastatischen Zellen solider Tumoren ebenfalls in der Lage sind, ein Rezidiv zu verursachen, kann derzeit nicht sicher beurteilt werden.

Um das Risiko eines Rezidivs durch akzidentelle Reimplantation disseminierter Tumorzellen mit autologen Blutstammzellprodukten zu minimieren, wird das Tumorzell-Purgings eingesetzt. Ziel des Purgings ist eine weitgehende Tumorzellelimination aus dem Autotransplantat unter Erhaltung der Stammzellen. Man unterscheidet hierbei die positiven und die negativen Selektionsverfahren. Bei den positiven Selektionsverfahren werden hämatopoetische Stammzellen über monoklonale Anti-CD34-Antikörper angereichert, was indirekt zu einer Tumorzelldepletion führt. Unter negativen Selektionsverfahren versteht man eine direkte Eliminierung von Tumorzellen durch chemische (zytotoxische Substanzen), immunologische (tumorspezifische, mit magnetischen Mikropartikeln oder Toxinen gekoppelte Antikörper), biologische (Inkubation mit Agglutininen) und biophysikalische (Phototoxizität) Methoden (Krüger et al. 1998 und Kvalheim 1996 a).

Durch den vermehrten Einsatz der Hochdosischemotherapie in der Mammakarzinombehandlung gewinnt die Frage nach der Relevanz der Tumorzellkontamination im Knochenmark- und in Stammzellprodukten zunehmend an Bedeutung.

Über zirkulierende Tumorzellen in der Blutbahn von Patienten mit soliden Tumoren wurde bereits im Jahre 1869 berichtet (Ashworth 1869). In den frühen achtziger Jahren gelang es erstmalig mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenserums, epitheliale Membranantigene (EMA) disseminierter Tumorzellen im Knochenmark in Ausstrichpräparaten nachzuweisen (Sloane et al. 1980).

In einer frühen Studie aus dem Jahre 1983 wurde erstmals über den Nachweis von MRD mit Hilfe einer neu entwickelten Methode, der immunhistochemischen Färbung,

berichtet, durch die epithelspezifische Strukturen zur Identifikation einzelner Tumorzellen im Knochenmark dargestellt werden sollten (Redding et al. 1983). Die Untersuchungen wurden an 110 Mammakarzinompatientinnen durchgeführt, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchungen in Vollremission befanden. Dazu wurde dem Knochenmark der Patientinnen ein gegen EMA gerichteter Primärantikörper zugesetzt, die Anfärbung des Antigen-Antikörperkomplexes erfolgte mittels der APAAP-Technik. So konnten die epithelialen Tumorzellen aufgrund ihrer Rotfärbung identifiziert werden, da sie im Gegensatz zu den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks EMA exprimieren. Derartige EMA-exprimierende Zellen ließen sich in einer Kontrollgruppe, bestehend aus 30 gesunden Knochenmarkspendern und 6 Patienten mit benignen Brustkrankungen, nicht nachweisen. Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden in insgesamt 28% der 110 Knochenmarkproben der Mammakarzinompatientinnen EMA-positive Zellen gefunden, während in den konventionell gefärbten Ausstrichen keine Tumorzellen nachweisbar waren. Andere Forschungsgruppen konnten zeigen, dass das Ausmaß der Tumorzellkontamination des Knochenmarks mit der Tumorgröße korreliert und dass bei positivem Knochenmarkbefund rascher eine Fernmetastasierung auftritt (Berger et al. 1988, Mansi et al. 1987).

Später wurden weitere spezifische monoklonale Antikörper eingesetzt, die gegen bestimmte Epitope des Zytoskeletts oder der Zellmembran epithelialer Zellen gerichtet waren, wie z.B. verschiedene Zytokeratine, 17-1A epitheliales Antigen und Östrogenrezeptoren (Thomas and Battifora 1987, Schlimok et al. 1987, Berger et al. 1987). Diese erwiesen sich als noch spezifischer und sensitiver im Nachweis epithelialer Tumorzellen als die gegen EMA gerichteten Antikörper, da bei den Anti-EMA-Antikörpern erfahrungsgemäß Kreuzreaktionen mit Leukozyten, insbesondere mit Plasmazellen, auftreten. Durch spezielle immunzytologische Färbemethoden wird der Komplex aus antigentragender, epithelialer Zelle und dem sogenannten Primärantikörper visualisiert. Dabei wird durch Anlagerung eines oder mehrerer weiterer Antikörper, die mit einem Enzymkomplex gekoppelt sind, sowie durch den Ablauf einer enzymatischen Reaktion der Farbumschlag herbeigeführt. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität stellt die Immunhistochemie bereits seit vielen Jahren die Standardmethode für den Nachweis disseminierter Malignomzellen dar.

Seit einigen Jahren gewinnt jedoch auch zunehmend die Polymerasekettenreaktion auf diesem Gebiet an Bedeutung. Dieses Verfahren wurde unter der Vorstellung eingeführt, noch höhere Sensitivitäten im Nachweis kleinster Mengen maligner Zellen erzielen zu

können als mit Hilfe der Immunhistochemie. Bei dieser Methode wird tumor- oder gewebespezifische mRNA mit Hilfe der Reversen Transkription in cDNA umgewandelt und nachfolgend mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Zum Nachweis disseminierter Tumorzellen häufig verwendete mRNA-Zielsequenzen sind das Carzinoembryonale Antigen (CEA) (Jung et al.1998, Zippelius et al.1997, Gerhard et al. 1994), die Zytokine 18, 19 und 20 (CK 18, 19 und 20) (Krüger et al. 1996, Jung et al.1998, Soeth et al. 1997, Krismann et al. 1995, Burchill et al. 1995), die Tyrosinase (Smith et al. 1991) und das Prostata-spezifische Antigen (PSA) (Zippelius et al.1997, Israeli et al. 1995).

Verfahren, die ebenfalls für den Nachweis der MRD genutzt werden, sind die Zellkulturassays. Bei dieser Methode wird histologisch normales Knochenmark für einige Zeit unter bestimmten Bedingungen in Zellkultur genommen, danach werden wie bei der Immunzytologie Zytospins angefertigt, diese angefärbt und unter dem Lichtmikroskop untersucht.

Mit dem Einsatz dieser Nachweisverfahren werden verschiedene Ziele verfolgt:

- Untersuchung der Relevanz der disseminierten Tumorzellen als Prognosefaktor für die Rezidivwahrscheinlichkeit und das Gesamtüberleben durch Korrelation mit etablierten Risikofaktoren und Follow-up-Daten mit dem Ziel, diese als klinisch anwendbare Screening-Methode verwenden zu können (Oruzio et al. 1997).
- Charakterisierung disseminierter Tumorzellen hinsichtlich ihres Geno- und Phänotypes, um tumorbiologische Vorgänge besser nachvollziehen und so adjuvante Therapieverfahren effektiver und individueller gestalten zu können (Oruzio et al. 1997).
- Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit adjuvanter Therapieverfahren durch Screening nach disseminierten Tumorzellen (Oruzio et al. 1997).
- Qualitätsbestimmung von für aPBSZT und aKMT vorgesehenen Probenmaterialien, wie Knochenmark und Leukaphereseprodukten bei HDC-Patienten (Krüger et al. 1996 a).
- Verbesserung der Möglichkeiten des Tumor-Stagings und - eventuell langfristig - Einbeziehung des Knochenmarksbefundes hinsichtlich disseminierter Tumorzellen in die TNM-Klassifikation (Jung et al. 1998).

2.4.2. Gegenüberstellung der Nachweisverfahren der MRD hinsichtlich Sensitivität und Spezifität

In der letzten Zeit wurde eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt, die die Methoden Immunzytologie und RT-PCR hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität zum Nachweis okkulten, epithelialer Tumorzellen einander gegenüberstellen. Dabei kamen die unterschiedlichen Arbeitsgruppen in einigen Bereichen zu einander widersprechenden Ergebnissen.

Die Immunzytologie galt in den letzten Jahren als Standard für den Nachweis okkulten Tumorzellen, in letzter Zeit gewinnt jedoch im klinischen Alltag zunehmend auch die RT-PCR-Methode für den Nachweis hämatologischer Malignome an Bedeutung.

2.4.2.1. Sensitivität

Die herkömmlichen Methoden, die vor der Entwicklung der modernen Nachweisverfahren Immunzytologie und Polymerasekettenreaktion zur Tumornachsorge und Verlaufsdagnostik eingesetzt wurden, sind zum Nachweis von Minimal Residual Disease in Hinblick auf ihre begrenzte Sensitivität nur begrenzt einsetzbar.

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie sind maligne Zellen, die einen Anteil von weniger als 1-10% der absoluten Zellzahl ausmachen, nicht nachweisbar. Auch zytogenetische Untersuchungen kommen über diese Sensitivität nicht hinaus, sind jedoch spezifischer, da sie mittels Analyse der chromosomalen Strukturen eine genauere Auskunft über die Art der Neoplasie geben.

Eine Erhöhung der Sensitivität kann erst durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden erreicht werden. Mitte der achtziger Jahre konnten erstmals durch die Methode der molekularen Hybridisierung tumorspezifische Rearrangements (Gensequenzen, die durch Rekombination entstehen) und Translokationen nachgewiesen werden und so das Vorhandensein einer MRD in der Vollremission gezeigt werden (Van Dongen et al. 1991). Der Nachweis erfolgt auf Ebene der cDNA, beim Southern-blot-Verfahren und bei der Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde wird die tumorspezifische Region mit einer Sensitivität von 10^2 erkannt.

Als Weiterentwicklung dieser Methode konnte sich Anfang der neunziger Jahre die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) etablieren, die jedoch ebenfalls nur eine Sensitivität von 10^2 erreicht. Bei dieser Methode werden mittels fluoreszenzmarkierter

DNA-Sonden tumorspezifische Translokationen, wie z.B. beim Philadelphia-Chromosom, nachgewiesen.

Durch die Einführung immunologischer Methoden konnte die Empfindlichkeit im Nachweis disseminierter Tumorzellen weiter gesteigert werden. Die Analyse von Zellen durch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) erfolgt nach Markierung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene. Diese Antigene werden jedoch auch in 0,01% der Fälle auf bestimmten Subpopulationen normaler Lymphozyten exprimiert, so dass die Spezifität der Methode beeinträchtigt ist. Setzt man Antikörper gegen tumorspezifische Fusionsproteine ein, wie beispielsweise bcr-abl im Falle der Philadelphia-Chromosom-positiven ALL, so erhält man spezifische Tumormarker und erhöht dadurch die Sensitivität der Methode (10^3).

Einen entscheidenden Fortschritt erzielte die MRD-Diagnostik mit der Verbreitung immunohistochemischer Färbemethoden. Diese basieren auf der Detektion spezifischer Antigene mittels monoklonaler Antikörper. Die so gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch eine enzymatische Farbreaktion visualisiert. Eine praktische Anwendung dieser Methode ermöglichten erstmals Kohler und Milstein 1975 durch Entwicklung der Hybridomtechnik, die die Herstellung großer Mengen monoklonaler Antikörper gegen spezifische Antigene verschiedener Gewebearten erlaubte. Die Immunhistochemie weist im Vergleich zu den bis dahin bekannten Nachweismethoden eine deutlich verbesserte Sensitivität von 10^4 bis max. $2 \cdot 10^6$ (Naume et al. 1997) auf und stellte damit bislang das Standardverfahren in der Diagnostik der MRD dar.

Ihre Sensitivität kann in Verbindung mit einer immunomagnetischen Tumorzellanreicherung vor der immunzytologischen Färbung sogar bis auf $1 \cdot 10^7$ gesteigert werden (Hempel et al. 1996 und Naume et al. 1997). Naume et al. (1997) gelang es, eine mittlere Sensitivitätserhöhung bis auf das 5,3fache der direkten Immunzytologie mittels der immunomagnetischen Separation zu erreichen. Man unterscheidet bei dieser Technik die positive und die negative immunomagnetische Separation (IMS). Bei der positiven IMS werden magnetische Mikropartikel eingesetzt, die an monoklonale Antikörper gegen epitheliale Oberflächenantigene gekoppelt sind, welche sich auch auf Tumorzellen epithelialen Ursprungs finden. Die so markierten Tumorzellen werden dann durch immunzytologische Färbung visualisiert. Bei der negativen IMS werden mit magnetischen Partikeln besetzte Antikörper gegen mononukleäre Zellen eingesetzt und anschließend die nicht antikörper-markierten Zellen immunzytologisch angefärbt.

Auch die Zellkulturverfahren konnten im Nachweis okkulten Tumorzellen durch Co-Kultivierung von Knochenmark mit Tumorzelllinien unter bestimmten Bedingungen eine Sensitivitätssteigerung auf etwa das 100fache erreichen (Joshi et al. 1990). Als ein möglicher Grund für die erhöhte Sensitivität im Nachweis okkulten Tumorzellen nach Zellkultur wird die Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch die Knochenmarkszellen diskutiert. Ob diese Sensitivitätserhöhung auch für okkulte Tumorzellen in Patientenproben gilt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht endgültig geklärt. Da die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zellkulturadaptiert waren, ist jedoch zu vermuten, dass die mögliche Sensitivitätssteigerung zum Nachweis von MRD überschätzt wird.

In letzter Zeit gewinnt die Polymerasekettenreaktion als Nachweisverfahren residueller Malignomzellen neben der Immunzytologie zunehmend an Bedeutung. Nach den Untersuchungsergebnissen von Jung et al. (1998) erreicht die RT-PCR-Methode beim Nachweis disseminierter Tumorzellen zurzeit die höchste Sensitivität von bis zu $1 \cdot 10^7$ in einer Reihe von Geweben und Körperflüssigkeiten. Eine Sensitivitätserhöhung durch die obengenannten immunologischen Anreicherungsverfahren ist auch bei der RT-PCR möglich (Eaton et al. 1997).

Eine Übersicht über die verschiedenen Nachweisverfahren disseminierter Tumorzellen bietet Tabelle 2.

Tabelle 2: Assays zum Nachweis von MRD und deren Sensitivität

Methoden	Marker	Sensitivität
Routinepathologie mit Lichtmikroskopie	Zellmorphologie	$10^1 - 10^2$
Zytogenetik	Chromosomenmorphologie	$10^1 - 10^2$
Hybridisierung, Southern-Blot	Genrearrangements, Translokationen	10^2
FISH	Translokationen	10^2
FACS-Analysen	Antigen-Profil	10^3
Immunhistochemie	Oberflächenantigene	$10^4 - 2 \cdot 10^6$
Zellkultur-Verfahren	In-Vitro-Wachstum und Oberflächenantigene	$10^4 - 10^7$
PCR	DNA-Sequenz	$10^5 - 10^7$

2.4.2.2. Spezifität

Zytokeratin 20 wurde erst kürzlich entdeckt und ist damit der letzte bisher identifizierte Zytokeratin-Isotyp (Moll et al. 1992). Es wird im Vergleich zu den so genannten „primitiven“ Zytokeratinen 8, 18 und 19 von vielen Untersuchern für sehr spezifisch gehalten, da es nur von einer begrenzten Anzahl von Gewebetypen exprimiert wird (Wang et al. 1995, Moll et al. 1990, 1992). Die Expression von CK20 wurde bislang als spezifisch für Merkelzellen, Epithelien des Magen-Darm-Trakts und des Urothels sowie für kolorektale Adenokarzinome, Adenokarzinome des Magens und des Pankreas angesehen (Moll et al. 1990, 1992, 1993, Soeth et al 1996). Über die Expression von CK20 in Epithelien und Adenokarzinomen anderen Ursprungs gibt es differierende Ergebnisse, so konnte unter Verwendung der Immunhistochemie mit Hilfe monoklonaler Antikörper Zytokeratin 20 sporadisch auch in normalerweise als CK20-negativ geltenden Epithelien der Mamma, Lunge und des Endometriums nachgewiesen werden (Moll et al. 1991, 1992, Wang et al. 1995). Burchill und Mitarbeiter konnten dagegen in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 keinen CK20-positiven PCR-Nachweis erbringen (Burchill et al. 1994). Die Arbeitsgruppe untersuchte weiterhin Blut- und Knochenmarkproben gesunder Spender mit Hilfe der CK20-RT-PCR-Methode und erhielt ausschließlich negative PCR-Ergebnisse, so dass bislang davon ausgegangen wurde, dass Zytokeratin 20 tatsächlich spezifisch für bestimmte Epithelzellen und aus hämatopoetischen Zellen gesunder Personen nicht transkribierbar sei (Burchill et al. 1994). Weitere Studien werden nötig sein, um das Expressionsmuster und die Umstände, die Zellen zu einer aberranten CK20-Expression anregen können, genauer zu verstehen.

Die Spezifität anderer mRNA-Zielsequenzen, die mit Hilfe der RT-PCR-Methode amplifiziert wurden, wurden dagegen bereits kontrovers diskutiert. Es existiert eine Vielzahl von Zielsequenzen, die für den Nachweis epithelialer Tumorzellen eingesetzt wurden. Häufige Verwendung finden verschiedene Zytokeratine (CK), vor allem CK 8, 18 (Traweek et al. 1993, Zippelius et al. 1997), 19 (Krisman et al. 1995, Traweek et al. 1993, Krüger et al 1996, Jung et al. 1998) und 20 (Soeth et al 1996, Burchill et al. 1995), außerdem das Carcinoembryonale Antigen (CEA) (Gerhard et al. 1994, Jung et al. 1998), das Prostataspezifische Antigen (PSA) (Israeli et al.1995, Zippelius et al. 1997), das Tyrosinase-Antigen (Smith et al. 1991), Mammaglobin (Zach et al. 1999) und MUC1 (Noguchi et al. 1996). Für den Nachweis von Mammakarzinomzellen werden häufig die Zytokeratine 18 (Traweek et al. 1993, Zippelius et al. 1997) und 19 (Krisman

et al. 1995, Traweek et al. 1993, Krüger et al 1996, Jung et al. 1998), das Carcinoembryonale Antigen (CEA) (Gerhard et al. 1994, Jung et al. 1998), Mammaglobin (Zach et al. 1999) und MUC1 verwendet (Noguchi et al. 1996).

Eine zentrale Rolle im Nachweis epithelialer Tumorzellen spielen vor allem die Zytokeratine. Sie gehören zur Familie der Intermediärfilamente, die primäre Bestandteile des Zytoskeletts von Epithelzellen sind. Es existieren mindestens 20 verschiedene Isotypen von Zytokeratinen, die ein streng an Zelllinie und Differenzierungsgrad gebundenes Expressionsmuster aufweisen (Moll et al. 1982, Sun et al. 1984).

Meist behalten maligne Zellen die Intermediärfilamente ihres Progenitorzelltypes bei, so dass es naheliegend ist, die Zytokeratine für den Nachweis epithelialer Tumorzellen zu verwenden (Osborn and Weber 1983, Cooper et al. 1985, Lane and Alexander 1990).

CK 8, 18 und 19 zählen zu den primitivsten Zytokeratinen, deren mRNA aufgrund ihrer ubiquitären Transkription durch Zellen epithelialen Ursprungs von vielen Arbeitsgruppen als Zielsequenz bei der Suche nach epithelialen Tumorzellen verwendet wurde (Traweek et al. 1993, Krüger et al. 1996, Datta et al. 1994, Schoenfeld et al. 1994). Auch in der Immunhistochemie wurden häufig monoklonale Antikörper gegen diese Zytokeratine eingesetzt (Schoenfeld et al. 1994, Zippelius et al 1997).

Frühe Untersuchungsergebnisse mit Zytokeratin-mRNA als Zielsequenz zeigen eine hohe Spezifität der RT-PCR zum Nachweis von Mammakarzinom-Zellen (Schönfeld et al. 1994, Chevillard et al. 1996, Luppi et al. 1996). Datta et al. konnten in ihrer Studie im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen CK 19-positive Zellen nachweisen, während 38 ihrer 39 Kontrollpatienten einen negativen Knochenmarkbefund aufwiesen (Datta et al. 1994).

Diese ersten Erfolg versprechenden Ergebnisse, in denen sich die RT-PCR als hochspezifische und sensible neue Methode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen darstellte, wurde jedoch bereits bald wieder angezweifelt, als in mehreren Studien auch in den Proben der gesunden Kontrollgruppe die mRNA-Zielsequenz amplifiziert wurde (Traweek et al. 1993, Krismann et al 1995, Zippelius et al. 1997). Es zeigte sich, dass die Expression dieser Zytokeratine nicht, wie zunächst vermutet, auf Epithelzellen beschränkt ist, sondern dass auch Zellen nicht-epithelialen Ursprungs, wie hämatopoetische Zellen, Stroma-, Endothel- (Traweek et al. 1993) und auch glatte Muskelzellen (Bader et al. 1988) unter bestimmten Bedingungen fähig sind, die Zytokeratine 8, 18 und 19 zu exprimieren.

So konnten Krismann und Mitarbeiter, die ebenfalls die CK19-mRNA als molekularen Marker verwendeten, im peripheren Blut ihrer Kontrollgruppe, bestehend aus 65 gesunden Spendern, eine unerwartet hohe CK19-mRNA-Expression von mindestens 20% nachweisen (Krismann et al. 1995). In einer kurz zuvor durchgeführten Studie von Wulf und Mitarbeitern wurde sogar in 75% der Knochenmarkproben von Kontrollpersonen eine CK19-Expression gefunden (Wulf et al. 1997).

Eine geringe Spezifität der RT-PCR zur Erfassung von disseminierten Tumorzellen fanden auch Zippelius et al. (1997). Sie untersuchten das Knochenmark von 63 Patienten mit Prostata- oder Mammakarzinom und von 53 Kontrollpatienten hinsichtlich der Transkription 8 verschiedener Marker-Gene: PSA, PSM, EGP-40, DPI 1, CEA, erb-B2, erb-B3 und CK 18.

7 der 8 Markertypen konnten zu einem erheblichen Prozentsatz (im Falle von EGP-40 und DPI in bis zu 100%) auch in den Knochenmarkproben der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Nur PSA-cDNA war aus keiner der Kontrollproben amplifizierbar.

Daraus ergibt sich die Frage nach den Ursachen dieser widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse in den verschiedenen Arbeitsgruppen trotz Untersuchung der gleichen mRNA-Zielsequenzen.

Als mögliche Gründe für die sehr unterschiedliche Spezifität der RT-PCR beim Nachweis von Mikrometastasen in den verschiedenen Studien kommen sowohl analytische als auch biologische Faktoren in Betracht.

Mögliche Schwachpunkte im analytischen Bereich sind unterschiedlich strukturierte Studien-Designs der verschiedenen Arbeitsgruppen, mangelnde Standardisierung des Untersuchungsablaufs innerhalb einer Testreihe, unterschiedliche Kriterien bei der Auswahl des Patienten- und Kontrollkollektivs und präanalytische Faktoren, die mit der RT-PCR interferieren. So wurde beispielsweise von einigen Arbeitsgruppen die Ficoll-Gradienten-Separation von anderen die Erylyse zur Gewinnung der mononukleären Zellfraktion (MNC) eingesetzt, zusätzlich arbeiteten einige Gruppen mit einer einfachen andere mit einer nested RT-PCR-Methode. Auch hinsichtlich der RNA-Purifikation unterschieden sich die Versuchsdesigns, einige Gruppen extrahierten ausschließlich die mRNA, andere dagegen die Gesamt-RNA.

An biologischen Faktoren, die die Spezifität der RT-PCR beeinflussen, wurde bislang für die Zytokeratin-Protokolle (v.a. Zytokeratin 18) die unspezifische Amplifikation von Pseudogenen neben der spezifischen Amplifikation der CK-mRNA beschrieben (Zippelius et al. 1997 und Neumaier et al.1995).

Seit kurzem wird auch die aberrante (low-level-) Transkription epithelspezifischer oder tumor-assoziiertes Gene in hämatopoetischen Zellen als mögliche Ursache für die unterschiedliche Spezifität der RT-PCR untersucht. Traweek et al. (1993) wiesen eine Expression der Zytokeratine 8, 18 und in geringerem Ausmaß auch 19 in Stromazellen und Zellen hämatopoetischen Ursprungs nach. Auch Krismann und Mitarbeiter (1995) konnten eine Expression von CK19-mRNA in normalen peripheren Blutzellen nachweisen.

Ein relativ neuer Erklärungsansatz für die sehr unterschiedliche Spezifität der RT-PCR in den verschiedenen Studien ist die Induktion der Ziel-mRNA durch bestimmte Faktoren, wie z.B. Entzündungsmediatoren bzw. Zytokine (Jung et al. 1998). Die Arbeitsgruppe um Jung vermutete, dass die widersprüchlichen PCR-Ergebnisse auch durch die unterschiedliche bzw. inhomogene Zusammensetzung der in den Studien verwendeten Kontrollkollektive verursacht sein könnten und teilten daher das inhomogene Kontrollkollektiv in kleinere und homogenere Untergruppen auf. Die Gruppe untersuchte somit neben Patienten mit epithelialen Tumoren und einer Gruppe von gesunden Kontrollpersonen auch ein Kollektiv von Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen und ohne malignen Tumor mit Hilfe der CK 19- und CEA-RT-PCR und konnte in dieser Gruppe eine Amplifikation der verwendeten mRNA-Zielsequenzen von bis zu 60% nachweisen. Es wurde daraufhin spekuliert, ob bestimmte Zytokine, die vom Körper während eines entzündlichen Prozesses gebildet werden, hämatopoetische Zellen induzieren können, epithelspezifische mRNA zu transkribieren. Um den möglichen Zusammenhang zwischen Entzündungsvorgängen und der Expression normalerweise epithelspezifischer Oberflächenantigene durch hämatopoetische Zellen genauer zu untersuchen, wurden in-vitro-Untersuchungen an hämatopoetischen Zellen vorgenommen, die mit und ohne Zytokin-Stimulation kultiviert wurden.

Die Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass Zytokine einen Einfluss auf die Transkription von normalerweise epithelspezifischen mRNA-Sequenzen durch hämatopoetische Zellen haben. Sie fanden für CK 19, dass alle untersuchten Knochenmarkproben nach siebentägiger Kultivierung mit Zytokin-Stimulation von

einem negativen zu einem positiven RT-PCR-Befund konvertierten. Dieses wurde als unspezifische Transkription der CK 19-mRNA von stimulierten Stromazellen während eines entzündlichen Prozesses gedeutet. Eine weitere Begründung könnte auch die direkte Freisetzung der CK 19-mRNA aus absterbenden Zellen aufgrund des Entzündungsprozesses sein. Traweek et al. (1993) kamen zu übereinstimmenden Ergebnissen, sie untersuchten die Keratinexpression hämatopoetischer Zellen mit Hilfe der RT-PCR. Dabei fanden sie im Knochenmark, im peripheren Blut und in Lymphknoten gesunder Spender keine CK 19-Expression, während eine CK 19-Transkription in Zellen stromalen Ursprungs, wie Fibroblasten und Endothelzellen, unter Zellkulturbedingungen induziert werden konnte.

Weiterhin scheint nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen die CEA-mRNA-Transkription spezifisch durch Interferon- γ (INF- γ) hochreguliert werden zu können (Jung et al. 1998). Dies steht in Einklang mit den Befunden von Takahashi und Mitarbeitern (1993), die eine Up-Regulation der CEA-mRNA durch INF- γ und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) für HT 29-Zellen in Zellkultur, sowie ein Interferon- γ -sensibles Element im CEA-Gen nachwiesen.

Die Vermutung, dass entzündliche Prozesse eine Transkription der Ziel-mRNA in hämatopoetischen Zellen induzieren können, wird dadurch unterstützt, dass sowohl INF- γ als auch TNF- α an der Zytokin-Kaskade der Akute-Phase-Reaktion beteiligt sind (Waage und Steinshamn 1993).

Schließlich ergab eine Untersuchung von Jung et al. (2001), dass die Transkription der Ziel-RNA in den verschiedenen Gewebetypen, wie Knochenmark, peripherem Blut und Lymphknoten unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

Die Bedingungen der Expression epithelialer Marker in hämatopoetischen Zellen stellen den Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit angestellten Untersuchungen dar. Vor allem die Rolle der Zytokine bei der Stimulation hämatopoetischer Zellen zur Expression spezifischer mRNA-Sequenzen wurde weitergehend intensiv untersucht.

Alle oben genannten Einflussfaktoren müssen bei der Entwicklung eines Studiendesigns für eine RT-PCR-Methode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen bedacht werden. Aufgrund der aufgezeigten und vermutlich noch vieler weiterer zurzeit noch nicht genauer erforschten Einflussfaktoren sowie der Vielzahl der verwendeten RNA-Zielsequenzen sind die Untersuchungsergebnisse nur begrenzt miteinander vergleichbar. Somit ist es zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich, die Spezifität der RT-PCR zum Nachweis okkulten Tumorzellen im Knochenmark abschließend zu beurteilen.

Eine Antwort auf die Frage, inwieweit die RT-PCR-Methode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im klinischen Alltag Verwendung finden kann, steht noch aus. Es gilt als erwiesen, dass die RT-PCR die Sensitivität der Immunzytologie erreicht und oft sogar noch übersteigt, sie ist also ein hochempfindliches Verfahren zum Nachweis von Mikrometastasen. Jedoch müssen die Faktoren, die auf die Spezifität der RT-PCR Einfluss nehmen und so zu falsch-positiven Ergebnissen führen, in weiteren Studien noch genauer erforscht werden, um die tumorbiologischen Vorgänge und Interaktionen unter den verschiedenen Zellfraktionen noch verständlicher zu machen, damit die PCR-Methode als Routineverfahren dem klinischen Alltag zugänglich gemacht werden kann.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Primer

Zytokeratin 20-Primer, Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland

Sequenzen (5' – 3'):

- CK20 outer sense: GCG TTT ATG GGG GTG CTG GAG
- CK20 outer antisense: AAG GCT CTG GGA GGT GCG TCT C
- CK20 inner sense: CGG CGG GGA CCT GTT TGT
- CK20 inner antisense: CAG TGT TGC CCA GAT GCT TGT G

GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)-Primer, Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland

Sequenzen (5' – 3'):

- GAPDH 1: CTG AGA ACG GGA AGC TTG TC
- GAPDH 2: AGG TCA GGT CCA CCA CTG AC

3.1.2. Zytokine

Es existiert eine Vielfalt von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, deren vielfältige Funktionen und Interaktionen noch nicht in allen Einzelheiten erschlossen sind. Sie haben unter anderem immunmodulatorische Funktion sowie Einfluss auf die Proliferation und Koloniebildung hämatopoetischer Zellen.

Funktionell wird für die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren die Zugehörigkeit zu einer von drei Gruppen beschrieben. Zur ersten oder auch „multilineage“ Gruppe gehören IL3 und GM-CSF, die Einfluss auf frühe Kolonie-formende-Einheiten (CFU) bzw. die pluripotente Stammzelle nehmen. Die zweite oder auch „unilineage“ Gruppe

setzt sich aus den Zytokinen EPO, TPO, G-CSF, IL5 und M-CSF zusammen, die auf spätere Stadien der hämatopoetischen Progenitorzellen einwirken. Die dritte oder „potenzierende“ Gruppe besteht aus IL6, IL11, SCF und Flt3-Ligand, die vorwiegend die Funktion haben, die Aktivität der anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren zu potenzieren.

Tabelle 3: Verwendete Zytokine

Zytokin	Firma
rHu TPO (Recombinant Human Thrombopoetin, Mpl-ligand, MGDF)	Fa. PromoCell, Heidelberg, Deutschland
rHu flt3-Ligand (Recombinant Human flt3-Ligand)	Fa. PromoCell, Heidelberg, Deutschland
human IL-3 (rekombinantes human IL-3)	Fa. Strathmann Biotech, Hannover, Deutschland
rHu Interleukin-6 (Recombinant Human Interleukin 6)	Fa. PromoCell, Heidelberg, Deutschland
rHu Interleukin-1 β (IL-1 β)	Fa. R+D Systems Minneapolis, USA
rHu Stem Cell Factor (Recombinant Human Stem Cell Factor, SCF)	Fa. Strathmann Biotech, Hannover, Deutschland
G-CSF (rekombinantes G-CSF)	Fa. R+D Systems Minneapolis, USA
rHu GM-CSF (rekombinantes GM-CSF)	Fa. R+D Systems Minneapolis, USA
rHu IFN- γ	eBioscience, San Diego, USA

Tabelle 4: Zytokine und deren Funktionen

Name	Abkürzung	Funktion
Thrombopoetin	TPO	Stimulation der Megakaryozyten zur Bildung von Thrombozytenvorstufen => Erhöhung der Anzahl zirkulierender Thrombozyten; Einfluss auf die Thrombopoese haben auch die Zytokine SCF, IL3, IL6, IL11

Name	Abkürzung	Funktion
Fms-like tyrosine kinase-3-Ligand	Flt3-Ligand	Ligand des kürzlich entdeckten Mitgliedes der dritten Klasse von Tyrosinkinase-Rezeptoren (RTKs); Potenzierung der Wirksamkeit anderer hämatopoetischer Faktoren; Stimulation der Lymphopoese; Stimulation der Proliferation und Koloniebildung von hämatopoetischen Precursorzellen, einschließlich CD34+-Zellen
Interleukin-3	IL-3	Stimulation der Leuko- (Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen) und Thrombopoese
Interleukin-6	IL-6	Stimulation der Thrombopoese; Lymphozyten-Wachstumsfaktor, Induktion der Plasmazell-Entwicklung; Besitz von sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungsmechanismen; Modulation der Knochenresorption; Einfluss auf die IL 4 Produktion
Interleukin-1 beta	IL-1 β	Immunmodulation, einschließlich der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten; (Freisetzung erfolgt vor allem durch Monozyten, jedoch auch durch verschiedene andere Zellen, wie Keratinozyten, Epithelzellen und Zellen des ZNS)
Stem cell factor ligand	SCF	Bindung an c-kit als Ligand, Mediator für Überleben, Wachstum und Funktion von hämatopoetischen Progenitorzellen und Mastzellen in frühen Stadien der Hämatopoese; wirkt synergistisch mit colony-stimulating-factors
Granulocyte-colony-stimulat.-factor	G-CSF	Stimulation der Leukopoese (Neutrophile, Makrophagen, Eosinophile)
Granulocyte-Macrophage-colony-stimulat.-factor	GM-CSF	Stimulation der Granulopoese (Neutrophile)
Interferon-γ	INF- γ	Antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Effekte, Anti-Tumor-Effekt.

3.1.3. Kits

RNA-Extraktion:

a) *Extraktion mit RNAzol™ B:*

- RNAzol™ B (Guanidinium-Isothiozyanat-Lösung), Fa. WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Solen, Deutschland
- Chloroform pro analysis, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- 2-Propanol, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glykogen for mol. biol. (Konz. 20 mg/ml), Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
- Ethanol absolut pro analysis, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

b) *Roti-Quick-Kit*, Fa. Roth, Rilchingen-Hanweiler, Deutschland

c) *RNeasy Midi Kit*, Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland

Reverse Transkription:

- *First strand cDNA Synthesis Kit*, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien

PCR:

- *RT-PCR-Kit*, Fa. Perkin Elmer, Branchburg, USA

3.1.4. Tumorzelllinien

Tabelle 5: Herkunft der Tumorzelllinien

Zelllinie	Firma	Zelltyp
MDA-MB-453 (HTB-131)	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA	Humanes Mammakarzinom, metastasiert, Erguss
MCF7 (HTB-22)	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA	Humanes Mammakarzinom, Pleuraerguss
HT-29 (HTB-38)	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA	Humanes Adenokarzinom des Kolons, mäßig differenziert (Grad 2)
K-562 (CCL-243)	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA	Humane CML, Blastenkrise, Pleuraerguss
Raji (CCL-86)	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA	Humanes Burkitt-Lymphom, lymphoblasten-ähnliche Zellen
U-937 (CRL-1593)	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA	Humanes histiozytäres Lymphom, monozytäre Zelllinie, Pleuraerguss
TF-1 (CRL-2003)	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA	Humane Erythroleukämie, Knochenmark-Aspirat
HBMEC	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA	Humane Hirn-Gefäßendothel-Zellen
HUV-EC-C (CRL-1730)	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen
MOLT-15	Fa. DSMZ, Braunschweig, Deutschland	Humane T-Zell-Leukämie, PB
WSU-NHL (ACC 58)	Fa. DSMZ, Braunschweig, Deutschland	Humanes B-Zell-Lymphom, Pleuraerguss
Fibroblasten	Primäre Zellen	Fibroblasten
HL-60	Frau Johanna Brandner, Hautklinik des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Primäre Zellen	Humane promyelozytische Leukämie, PB

3.1.5. Reagenzien und Chemikalien

- *Molecular Biology Grade Agarose*, Fa. Eurogentec, Seraing, Belgien
- *DNA-Größenmarker pBR322/Bsu Ri (HaeIII) Marker 5*, Fa. Fermentas, Vilnius, Litauen
- *Ethidiumbromid*, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland
- *100mM dNTP Mix*, Fa. Stratagene, La Jolla, USA
- *Dimethylsulfoxid (DMSO)*, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.6. Puffer, Medien und Reagenzien für die Zellkultur

- *Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)*, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland
- *Minimum Essential Medium Eagle (MEM-Eagle)*, Fa. Sigma, St. Louis, USA
- *RPMI-Medium 1640 with L-Glutamin*, Fa. Sigma, St. Louis, USA
- *Fetales Calf Serum (FCS)*, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland
- *L-Glutamine 200mM*, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland
- *Natriumpyruvat 1 mM*, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland
- *Penicillin-Streptomycin Solution*, Fa. Seromed/Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- *Tryptan Blue Stain 0,4%*, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland
- *Trypsin-EDTA 100ml*, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland
- *Dimethylsulfoxid Secco Solvⁿ*, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- *Ficoll Separating Solution*, Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
- *Gel-Ladepuffer*, Bromphenolhaltig

- *Erylyse-Puffer* Ammoniumchlorid (NH₄Cl) 4,15 g (= 155 mM)
Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO₃) 0,5 g (= 10 mM)
EDTA 0,02 g (= 0,1 mM)
Aqua bidest. ad 500 ml (steril-filtriert)
- *TE-Puffer (1x)* Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM
EDTA 1 mM
- *TAE-Puffer (50x)* Trisbase 242g
Eisessig 57,1 ml
0,5 M EDTA 100ml
Aqua bidest ad 1 l

3.1.7. Einwegmaterialien

- *Einmal-Pipettenspitzen 10, 100 und 1000µl*, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- *Sterilfilter-Tips ART 20E, 100E und 1000E*, Fa. Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA
- *Einmal-Kristallpipettenspitzen mit Wechseleinsatz 0,5-10,0µl*, Fa. Roth, Rilchingen-Hanweiler, Deutschland
- *Sterile Pipetten Falcon (einzeln verpackt) 5 und 10ml*, Fa. Becton Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA
- *Sterile Pipetten (einzeln verpackt) 10ml und 25ml*, Fa. Greiner Labortechnik, Esslingen, Deutschland
- *Safe-Lock (PCR-Tubes) 0,5ml, 1,5ml und 2,0ml*, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- *Cryo Tubes 1,8ml*, Fa. NUNC, Roskilde, Dänemark
- *Gewebekulturflaschen 50ml*, Fa. Greiner Labortechnik, Esslingen, Deutschland
- *Suspensionskulturflaschen 50ml*, Fa. Greiner Labortechnik, Esslingen, Deutschland

- *Gewebekulturflaschen 250ml*, Fa. NUNC, Roskilde, Dänemark
- *Suspensionskulturflaschen 250ml*, Fa. Greiner Labortechnik, Esslingen, Deutschland
- *Falcon-Röhrchen 50ml*, Fa. Becton Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA
- *Konische Röhrchen 15ml*, Fa. Becton Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA
- *Sterile Filter, 25 mm Porengröße 0,45µm*, Fa. Millipore, Eschborn, Deutschland
- *High Density Printing Paper Typ II, UPP-110 HD*, Fa. Sony, Köln-Ossendorf, Deutschland
- *Mikrotiterplatte 96-wells*, Fa. Greiner Labortechnik, Esslingen, Deutschland
- *Elisa V-Platte Immulon*, Fa. Greiner Labortechnik, Esslingen, Deutschland

3.1.8. Geräte

- *Brutschrank: CO₂-Schrank (CO₂-Autosero)*, Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland
- *Spektrometer Uvikon*, Fa. Kontron instruments, Bissendorf, Deutschland
- Zentrifugen:
 - *Tischzentrifuge Hettrich Mikroliter*, Fa. Wilke med-technik, Hamburg, Deutschland
 - *Tischzentrifuge Mikrozentrifuge Modell 5415C*, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - *Kühlzentrifuge Kendro Megafuge 1,0R*, Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland
 - *Kühlzentrifuge Sigma K10*, Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA
- Mikroskope:
 - *Auflichtmikroskop Wilovert S*, Fa. Hund, Wetzlar, Deutschland
 - *Lichtmikroskop Biomed*, Fa. Leitz, Wetzlar, Deutschland
- *Sicherheitsbank: Horizontal Flow Clean Bench, Clean Air*, Brooklyn Park, Minnisota, USA

- Zellcounter: *MD8 Coulter-Counter*, Beckman Coulter Electronics GmbH, Krefeld, Deutschland
- *Elektrophorese-Kammer Agagel Maxi*, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien
- *Elektrophorese-Spannungsgerät LBK Multi Drive XL Power Supply*, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien
- *UV-transparentes Geltablett, 10 × 20cm und 20 × 20cm*, mit Kammhalter, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
- *UV-Tisch Fluo-link*, Fa. ASG, Herning, Dänemark
- *Gel-Video-Dokumentationsgerät: MWG*, Fa. Biotech, Melbourne, Australien
- *Gel-Print 2000 i*, Fa. Sony, Köln-Ossendorf, Deutschland
- Thermocycler für PCR:
 - *UNO-Thermoblock*, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
 - *T-Gradient*, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
- Heizblöcke:
 - *Techne DRI-Block DB*2A*, Fa. Techne Laboratory Equipment, Cambridge, Großbritannien
 - *Thermomixer 5436*, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipettierhilfen:
 - *Pipetboy*, Fa. Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
 - *Accupipex*, Fa. Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland
- *Pipetten: Größe 10, 20, 100, 200, 1000 µl*, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. Patientenproben: Knochenmark, mobilisierte Blutstammzellen und peripheres Blut

Das Patientenkollektiv, dessen Knochenmark, mobilisierte Blutstammzellen und peripheres Blut untersucht wurde, setzte sich aus zwei verschiedenen Patientengruppen zusammen.

Die eine Gruppe bestand aus Patientinnen mit Mammakarzinom, die andere aus Patienten ohne Mammakarzinom mit überwiegend hämatologischen Erkrankungen und gesunden Fremdspendern. Die zweite Gruppe diente als Negativkontrolle oder zur Stimulation mit Wachstumsfaktoren.

Das Einverständnis zur Verwendung des Materials im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen wurde von den Patienten eingeholt.

Die Knochenmarkentnahme erfolgte in Intubationsnarkose, Spinal- oder Lokalanästhesie aus dem Beckenkamm in der Abteilung für Knochenmarktransplantation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Um eine Koagulation zu verhindern, wurde den Knochenmarkproben 1000 I.E. Heparin pro ml zugesetzt.

Die Mobilisation der Stammzellen erfolgte durch subcutane Applikation von jeweils 10-24 µg/kg Körpergewicht des rekombinanten, humanen Wachstumsfaktors G-CSF (Filgrastim) über einen Zeitraum von 5 Tagen. Die Leukapherese wurde in der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit Hilfe eines Zellseparators durchgeführt. Die Entnahme der peripheren Blutproben erfolgte in EDTA-Monovetten auf den Stationen der Abteilung für Knochenmarktransplantation sowie der onkologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Das verwendete Patientenmaterial wurde in der Regel umgehend, anderenfalls am Folgetag nach Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C der experimentellen Verarbeitung zugeführt.

Es wurden insgesamt 88 Proben von Mammakarzinompatientinnen und 56 Proben von Kontrollpersonen ohne Mammakarzinom untersucht. Die zweite Gruppe setzte sich aus gesunden Spendern sowie Patienten mit hämatologischen Tumoren oder Sarkomen

zusammen. Insgesamt wurden 56 Knochenmarkproben, 50 Blutstammzellproben und 38 Proben peripheres Blut auf die CK20-mRNA-Sequenz untersucht. Eine genaue Übersicht über die verwendeten Proben gibt Tabelle 6.

Tabelle 6: Patientenproben

	<i>Knochenmark</i>	<i>Blutstammzellen</i>	<i>Peripheres Blut</i>
Mammakarzinom	28	35	25
Plasmozytom	1	2	2
Akute myeloische Leukämie	4	8	6
Akute lymphatische Leukämie	1		2
Chronisch myeloische Leukämie	8		1
Myelodysplastisches Syndrom	1		
Hodgkin-Lymphom			1
Non-Hodgkin-Lymphom		1	1
Ewing-Sarkom		1	
Fibrosarkom		2	
Gesunde Fremdspender	13	1	

Unter den Mammakarzinompatientinnen befanden sich 46 mit nodal-positivem, 8 mit inflammatorischem, 20 mit metastasiertem Karzinom und 14, zu denen keine weiteren klinischen Angaben bekannt waren.

3.2.2. Gewinnung der mononukleären Zellfraktion

Zur Extraktion der mononukleären Zellfraktion aus dem peripheren Blut, mobilisierten Blutstammzellen, Knochenmark und Buffy Coat wurden zwei verschiedene Methoden verwendet:

1. Die Ficoll-Gradienten-Separation
2. Die Erylyse

3.2.2.1. Ficoll-Gradienten-Separation

Mit Hilfe der Dichtezentrifugation über den Ficollgradienten wurde die mononukleäre Zellfraktion, wie von Soeth und Mitarbeitern (Soeth et al. 1996) beschrieben, als Probenmaterial isoliert. Durch dieses Verfahren wurde die weitgehende Entfernung von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten erreicht. Die Dichte des Flotationsmittels Ficoll hypaque war mit 1,077 g/ml so gewählt, dass sich die mononukleären Zellen entsprechend ihrer Dichte an der Grenzschicht zwischen Plasma und Ficoll anreicherten. Die Erythrozyten dagegen setzten sich als Pellet am Boden ab. Zur Ficoll-Extraktion wurde das Ausgangsmaterial im Verhältnis 1:2 mit Phosphate buffered saline (PBS) verdünnt und nachfolgend in sterilen 50 ml Falconröhrchen vorsichtig auf 15 ml Ficoll aufgeschichtet, so dass sich die Phasen nicht vermischten. Anschließend wurde für 30 min bei 1400 min⁻¹ und 20 °C ohne Bremse zentrifugiert. Nun wurde die mononukleäre Zellschicht abpipettiert und in ein neues steriles Falconröhrchen überführt. Die so erhaltene Zellfraktion wurde gewaschen, indem sie mit 50 ml PBS aufgefüllt und erneut für 10 min bei 1400 min⁻¹ und 20 °C mit Bremse zentrifugiert wurde. Dadurch konnten verbleibende Thrombozyten und Ficoll entfernt werden. Das Zellpellet wurde in einer geringen Menge PBS resuspendiert und konnte nun nach Bedarf weiterverarbeitet werden.

Die automatische Zellzählung wurde mit dem Coulter Counter durchgeführt.

3.2.2.2. Erylyse

Bei diesem Verfahren wurde die Leukozytenfraktion isoliert, indem die im Probenmaterial enthaltenen Erythrozyten, wie von Datta et al. 1994 beschrieben, durch Zugabe eines speziellen Erylyse-Puffers lysiert wurden.

Zusammensetzung des Erylyse-Puffers:

Ammoniumchlorid (NH₄Cl) 4,15 g (= 155 mM)

Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO₃) 0,5 g (= 10 mM)

EDTA 0,02 g (= 0,1 mM)

Aqua bidest. ad 500 ml (steril filtriert)

Dazu wurde das Ausgangsmaterial im Verhältnis 1:10 mit gekühltem Erylysepuffer verdünnt und für 5 min unter gelegentlichem Schütteln bei - 20 °C gekühlt. Nun wurde für 10 min bei 1500 min⁻¹ und 20 °C mit Bremse zentrifugiert. Enthielt das Zellpellet

anschließend noch sichtbar Erythrozyten (rote Färbung), wurde der Erylysevorgang wiederholt, ansonsten wurde die Leukozytenfraktion in einer geringen Menge PBS resuspendiert und der automatischen Zellzählung mit dem Coulter Counter zugeführt.

3.2.3. Tumorzelllinien und Verdünnungsreihen

Um die Sensitivität der CK20-RT-PCR zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen aus Kolon- und Mammakarzinomzellen hergestellt. Dazu wurde die Tumorzelllinie HT29, die einem Adenokarzinom des Kolons entstammt, sowie die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-453 verwendet. Die Tumorzelllinien wurden unter Standardbedingungen, entsprechend den Empfehlungen der Vertreiber, im Brutschrank bei 37 °C mit 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Bebrütung erfolgte in Gewebekulturflaschen von 50 bzw. 250 ml Volumen, die als Monolayer mit 5 bzw. 15 ml Kulturmedium überschichtet wurden. Als Kulturmedium wurde Minimum-essential-medium(MEM)-Eagle mit nicht essentiellen Aminosäuren verwendet, welchem je 500 ml Flasche 50 ml fetales Kälberserum, 5 ml 1 mM Natrium-Pyruvat und 5 ml 1 mM Glutamin zugesetzt wurden. Die Fütterung der Zellen erfolgte zweimal wöchentlich mit 5 bzw. 15 ml (je nach Größe des Gewebekulturflasche) des oben beschriebenen Kulturmediums, die Subkultivierung durch Abtrypsinierung nach jeweils 7 Tagen.

Beim Umsetzen der Zellen für die Subkultivierung oder auch bei der Zellgewinnung zur experimentellen Weiterverarbeitung wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurde das Medium aus den bereits konfluent bewachsenen Gewebekulturflaschen abpipettiert, zum Waschen mit 3 ml PBS überschichtet und für 10 min im Brutschrank gelagert. Anschließend wurde das PBS abpipettiert und die adhärennten Zellen mit 1 ml Trypsin von der Kulturflaschenwand gelöst. Das Trypsin wurde nicht länger als 1-2 min belassen, da es sonst zur Proteolyse der Nukleinsäuren der Zellen führen kann. Nach Entfernung des Trypsins wurden die Gewebekulturflaschen für weitere 15 min im Brutschrank gelagert. Danach wurden die Zellen entweder in Medium zur weiteren Kultivierung resuspendiert oder zur zur experimentellen Weiterverarbeitung in PBS aufgenommen. Bei Verwendung der 250 ml-Gewebekulturflaschen wurde jeweils die dreifache Menge der angegebenen Reagenzien genommen.

Für die Kryokonservierung der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -194 °C wurde dem Kulturmedium 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. Es wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen in

einem Volumen von 1 ml Einfriermedium aufgenommen und für ca. 2-3 Tage bei -80°C gelagert, bevor sie in den Tank mit flüssigem Stickstoff überführt wurden.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C , wobei die Zellsuspension sofort nach dem Auftauen in ca. 10 ml Medium aufgenommen und für 5 min bei 1000 min^{-1} und 20°C mit Bremse zentrifugiert wurde, um so eine Schädigung der Zellen durch das DMSO zu vermeiden. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Vitalitätskontrollen wurden unter dem Lichtmikroskop in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt, ebenso die Bestimmung der Zellzahl. Diese wurde häufig auch mit dem Coulter Counter ermittelt.

Aus den gewonnenen mononukleären Zellfraktionen des Buffy Coats sowie der epithelialen Tumorzelllinien HT29, MDA-MB-453 und MCF-7 wurden Verdünnungsreihen hergestellt, mit deren Hilfe die Sensitivität der CK20-RT-PCR-Methode ermittelt wurde. Durch die Verdünnungsreihen konnte die Mikrometastasierung ins Knochenmark in jeweils genau definierter Menge in vitro simuliert werden. Es wurden für die genannten Tumorzelllinien die Verdünnungsstufen 10^{-2} - 10^{-7} hergestellt, wobei jeder Versuchsansatz insgesamt $2 \cdot 10^7$ Zellen enthielt. Die Verdünnungsreihe erhielt man, indem man im ersten Reaktionsgefäß $1,98 \cdot 10^7$ mononukleäre Zellen vorlegte und durch Zugabe von $0,02 \cdot 10^7$ Tumorzellen eine erste Verdünnung von 10^{-2} erstellte. Danach wurden in fünf weiteren sterilen Reaktionsgefäßen je $1,8 \cdot 10^7$ mononukleäre Zellen, also $9/10$ der Gesamtzellzahl, vorgelegt und jeweils aus der vorhergehenden, nächstgeringeren Verdünnungsstufe $0,2 \cdot 10^7$ Zellen der Zellsuspension, also $1/10$ der Gesamtzellzahl, dazupipettiert, so dass die Tumorzellkonzentration von Verdünnungsstufe zu Verdünnungsstufe um je eine 10er-Potenz abnahm. Durch dieses Vorgehen wurde die Herstellung auch höherer Verdünnungsstufen bis 10^{-7} ermöglicht. Bei einer Ausgangstumorzellzahl von $2 \cdot 10^7$ Zellen enthielt eine Verdünnung von 10^{-7} also statistisch gesehen im Mittel genau 2 Tumorzellen.

Die so entstandenen Verdünnungsreihen wurden im Folgenden der RNA-Extraktion und CK20-RT-PCR zugeführt und die Nachweisbarkeitsgrenze der Tumorzellkonzentration mit Hilfe der Gel-Elektrophorese visualisiert.

3.2.4. Zytokin-Stimulation von Zelllinien und Patientenproben

Es wurden verschiedene Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs sowie Knochenmark und mobilisierte Stammzellen von Patienten ohne epitheliale Tumorerkrankung vor und nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen mit Hilfe der CK20-RT-PCR untersucht, um herauszufinden, inwieweit die Exposition gegenüber Wachstumsfaktoren Einfluss auf die Zytokeratin 20-Transkription dieser Zellen und damit auf die Spezifität der CK20-RT-PCR als Nachweismethode für epitheliale Tumoren hat.

Im Einzelnen wurden folgende Zelllinien betrachtet (siehe Tabelle 7):

Tabelle 7: Zelllinien

Name	Beschreibung	Firma/Herkunft
K-562	CML, Blastenkrise	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA
U937	Monozytäre Zelllinie, histiozytäres Lymphom	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA
HL-60	Promyelozytische Leukämie	Primäre Zellen; Frau Johanna Brandner, Hautklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TF 1	Akute Erythroleukämie	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA
Raji	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA
Fibroblasten	Primäre Zellen	Primäre Zellen

Diese Zelllinien wurden zunächst in Kultur genommen, um eine ausreichende Zellzahl für die PCR-Untersuchung vor und nach Zytokin-Stimulation zu erhalten. Die Kultivierung erfolgte unter den bereits im Kapitel 3.2.3 beschriebenen Standardbedingungen.

Die Zelllinien K-562, U937, TF 1 und Raji wachsen nicht adhärend und wurden daher

in Suspensionskulturflaschen von 50 bzw. 250 ml Volumen in 5 bzw. 15 ml Medium bebrütet. Die Fibroblasten gehören dagegen zu den adhärennten Zellen. Sie wurden in Gewebekulturflaschen von 50 bzw. 250 ml Volumen gezüchtet, die als Monolayer mit 5 bzw. 15 ml Medium überschichtet wurden. Die Fütterung der Zellen erfolgte in allen Fällen zweimal wöchentlich mit Kulturmedium. Die adhärennt wachsenden Zellen wurden zusätzlich einmal pro Woche umgesetzt (siehe Kapitel 3.2.3). Besonderheiten bei der Fütterung sowie die dafür verwendeten Medien können Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: Verwendete Medien für die Zellkultur

Zelllinien	Kulturmedium
K-562	RPMI+10% FCS+Penicillin/Streptomycin: Kultivierung in 250 ml-Flaschen mit 15 ml Medium; bei Fütterung je 10 ml abpipettieren und neu zugeben
U937	RPMI+ 10% FCS+Penicillin/Streptomycin: Kultivierung in 50 ml-Flaschen mit 5 ml Medium; bei Fütterung je 4 ml abpipettieren und neu zugeben
HL-60	RPMI+ 10% FCS+Penicillin/Streptomycin: Kultivierung in 50 ml-Flaschen mit 5 ml Medium; bei Fütterung je 4 ml abpipettieren und neu zugeben
TF 1	RPMI+10% FCS+Penicillin/Streptomycin+1000 U/ml GM-CSF: Kultivierung in 50 ml-Flaschen mit 5 ml Medium; bei Fütterung je 4 ml abpipettieren und neu zugeben
Raji	RPMI+10% FCS+Penicillin/Streptomycin: Kultivierung in 250 ml-Flaschen mit 15 ml Medium; bei Fütterung je 10 ml abpipettieren und neu zugeben
Fibroblasten	MEM+10% FCS+Penicillin/Streptomycin: Kultivierung in 250 ml-Flaschen mit 15 ml Medium; Bei Fütterung Medium komplett abpipettieren und neu zugeben; einmal wöchentlich Zellen umsetzen (siehe Kapitel 3.2.3)
HT29	MEM+10% FCS: Kultivierung in 50 ml-Flaschen mit 5 ml Medium; Bei Fütterung Medium komplett abpipettieren und neu zugeben; einmal wöchentlich Zellen umsetzen (siehe Kapitel 3.2.3)
MCF-7	MEM+10% FCS: Kultivierung in 50 ml-Flaschen mit 5 ml Medium; Bei Fütterung Medium komplett abpipettieren und neu zugeben; einmal wöchentlich Zellen umsetzen (siehe Kapitel 3.2.3)
MDA-MB-453	MEM+10% FCS: Kultivierung in 50 ml-Flaschen mit 5 ml Medium; Bei Fütterung Medium komplett abpipettieren und neu zugeben; einmal wöchentlich Zellen umsetzen (siehe Kapitel 3.2.3)

Jedem Kulturmedium wurden pro 500 ml außerdem 5 ml 1 mM Natrium-Pyruvat und 5 ml 1 mM Glutamin zugesetzt.

Des Weiteren wurden die Knochenmark- und Stammzellproben von insgesamt 22 Patienten ohne epitheliale Tumorerkrankung vor und nach Zytokin-Stimulation untersucht, darunter 12 Knochenmarkaspirate und 10 Leukapheresen. Bei diesen Patienten handelte es sich im Einzelnen um 3 Patienten mit Plasmozytom, 5 mit AML, 2 mit CML, 1 mit ALL, 1 mit Non-Hodgkin-Lymphom, 1 mit Myelodysplastischem Syndrom, 1 mit Ewing-Sarkom, 1 mit Weichteilsarkom, 1 mit Fibrosarkom und 6 gesunde Spender.

Zur Stimulation wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Zytokine in den genannten Konzentrationen verwendet.

Tabelle 9: Arbeitskonzentrationen der Zytokine für die Stimulation

Zytokin	Arbeitskonzentration in U/ml
TPO	1
FLT3	0,2
IL-3	20
IL-6	10000
IL-1B	1000
SCF	5
G-CSF	500
GM-CSF	500
INF-γ	50

Für die Zytokin-Stimulation wurden von jeder Zelllinie und jeder Knochenmark- und Stammzellprobe jeweils $2 \cdot 10^7$ Zellen in unterschiedlichen Zellkulturflaschen mit je einem Zytokin versetzt und für 7 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Während dieser Zeit wurden die Zellkulturen ein- bis zweimal mit dem zytokinhaltigen Medium gefüttert. Zusätzlich wurde von jeder Probe eine Kontrollkultur als Negativkontrolle angelegt, die in Medium ohne Zytokin-Zusatz kultiviert wurde. Nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen wurden die Zellen abgeerntet, mit PBS gewaschen und entweder sofort der RNA-Extraktion zugeführt oder bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung tiefgefroren.

Insgesamt wurden 339 Zellkulturflaschen zur Zytokin-Stimulation angelegt. Zelllinien wurden dabei in 169 Flaschen kultiviert, klinische Knochenmark- und Stammzellproben in 170 Flaschen.

3.2.5. Zytokeratin 20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Die Zytokeratin 20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion dient dazu, CK20-exprimierende Zellen in Patientenproben und Zelllinien zu detektieren. Sie wurde zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit kolorektalem oder Pankreaskarzinom bereits von E. Soeth und Mitarbeitern beschrieben (Soeth et al. 1996). Die CK20-PCR-Methode zum Nachweis disseminierter Mammakarzinomzellen wurde auf der Grundlage des Protokolls von Soeth et al. entwickelt und für die vorliegende Arbeit hinsichtlich der Kriterien Spezifität und Sensitivität optimiert.

Der Nachweis der messenger-RNA des humanen CK20-Gens wurde mit Hilfe einer zweischrittigen Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion erbracht. Das CK20-Gen besteht aus ca. 18 Kilobasenpaaren (exakt 18061 Basenpaaren) mit 8 Exons und 7 Introns. Die Größe der mRNA liegt bei ca. 1,5 Kilobasenpaaren (exakt 1461 Basenpaaren). Die Daten wurden über die EMBL/GenBank/DDBJ Database bezogen und dieser Datenbank 1993 von Moll et al. überlassen. Zielsequenz ist eine Basenabfolge innerhalb der mRNA des Zytokeratin 20-Gens.

Zunächst wurde die zelluläre RNA aus den Zellen des Probenmaterials herausgelöst. Der Abschnitt, auf dem die spezifische Basenabfolge lokalisiert ist, wurde mit Hilfe der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und in einer nested PCR amplifiziert. Bei dieser Form der PCR wurden zwei Amplifikationszyklen hintereinander geschaltet. Im ersten Zyklus wurde dabei ein äußeres Primerpaar verwendet, welches ein größeres cDNA-Fragment überspannt, und im zweiten Zyklus ein inneres (nested) Primerpaar, welches innerhalb des ersten Amplifikationsproduktes eine kleinere cDNA-Sequenz umfasst. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend in der Gel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Um die Integrität der RNA sicherzustellen, wurde parallel zu jedem PCR-Zyklus der CK20-Basenabfolge eine cDNA-Sequenz des ubiquitär vorkommenden Housekeeping-Gens GAPDH koamplifiziert. Das CK20-spezifische RT-PCR-Produkt weist eine molekulare Größe von 485 bp (Basenpaaren), das GAPDH-spezifische Amplifikat eine Größe von 359 bp auf. Eine Interferenz mit Pseudogenen trat im Rahmen unserer Untersuchungen nicht auf.

Es wurden pro Patientenprobe jeweils $2 \cdot 10^7$ mononukleäre Zellen für die RT-PCR-Untersuchung eingesetzt.

3.2.5.1. RNA-Extraktion

Das Zellmaterial, welches entweder aus Patientenproben oder aus kultivierten Zelllinien stammte, wurde entweder direkt nach Entnahme bzw. nach Abernten der Zellen aus der Kultur weiterverarbeitet oder bis zur RNA-Extraktion bei -80 °C zwischengelagert.

3.2.5.1.1. Schutzmaßnahmen

Um eine Degradation der RNA beim Isolationsvorgang zu vermeiden, wurden folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen:

Für die RNA-Extraktion wurden nur sterile Einwegmaterialien und zuvor autoklavierte Arbeitsmaterialien verwendet und alle Arbeitsschritte erfolgten unter dem Abzug oder dem Laminar-Air-Flow, um eine Schädigung der RNA durch Einwirkung von Nukleasen zu verhindern. Alle bei der Isolation benötigten Puffer und Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem bidest. H₂O angesetzt. Alle Arbeitsvorgänge (Zugabe von Lösungen, Inkubation, Zentrifugation usw.) wurden, soweit möglich, auf Eis bzw. in Kühlzentrifugen bei 4 °C durchgeführt, um möglicherweise noch vorhandene RNase-Aktivitäten zu minimieren.

3.2.5.1.2. Durchführung der RNA-Isolation

Bei der durchgeführten Isolierung der zellulären RNA handelte es sich im Wesentlichen um eine modifizierte Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987).

Zunächst erfolgte die Denaturierung der Zell- und Zellkernmembranen mit RNAzol, um die Nukleinsäuren aus dem Kern zu entlassen. Anschließend wurde durch Ausfällung der RNA auf Phenol-Chloroformbasis die RNA von der DNA und den Proteinen getrennt und in den folgenden Arbeitsschritten von Salzrückständen gereinigt.

Im Einzelnen wurde mit den nachstehend genannten Reagenzien nach folgendem Protokoll vorgegangen.

Reagenzien:

- RNAzol™ B

- Chloroform
- Isopropanol
- Glykogen
- Ethanol per analysis 75%
- DEPC-H₂O
- TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, (pH 7,5), 1 mM EDTA

RNA-Extraktions-Ansatz:**Homogenisierung:**

1. RNA-Pellets zu je $2 \cdot 10^7$ Zellen in jeweils 2 ml RNAzol aufnehmen und in 15 ml Falcon-Röhrchen geben.
2. Proben vortexen, um die Zellen zu lysieren, dann auf Eis stellen.

RNA-Extraktion:

3. 200 µl Chloroform pro RNA-Probe unter dem Abzug zugeben.
4. Proben vortexen, bis sie milchig werden, dann für 5 min auf Eis kühlen.
5. Proben danach für 30 min bei 4 °C und 6000U/min zentrifugieren.

Präzipitation:

6. Die oberste wässrige Phase, in der die RNA gelöst ist, aus dem Falcon-Röhrchen abpipettieren und in ein steriles e-Cup überführen.
7. 500 µl Isopropanol auf den abpipettierten Überstand geben.
8. 2,5 µl Glykogen zum Anfärben der RNA zu den Proben geben und gut vortexen.
9. Die Proben für mindestens 30 min oder über Nacht bei -20 °C inkubieren.
10. Proben danach für 20 min bei 4 °C und 6000 U/min zentrifugieren. Es bildet sich dabei ein weiß-gelbes Pellet am Boden des e-Cups.

RNA-Waschvorgang:

11. Den Überstand dekantieren und 750 µl Ethanol 75% zugeben.
12. Proben erneut für 20 min bei 4 °C und 6000 U/min zentrifugieren.
13. Den Waschvorgang (Schritte 11. und 12.) wiederholen.
14. E-Cups dekantieren und die Pellets trocknen lassen.
15. 30-50 µl DEPC-H₂O (0,1%) pro Probe hinzu pipettieren und die getrockneten Pellets durch mehrfaches Durchmischen mit der Pipette darin auflösen.
16. Proben für 10 min bei 70°C im Heizblock inkubieren.
17. Proben zunächst auf Eis kühlen, die gewonnene RNA dann entweder sofort der RT zuführen oder bis zur Weiterverarbeitung in 0,1% DEPC-H₂O bei -80 °C lagern.

3.2.5.1.3. Bestimmung der Ausbeute

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm in einem UV-Spektrometer. Hierzu wurde die RNA 1:100 mit 1x TE-Puffer verdünnt, die Messung der Extinktion bzw. der optischen Dichte erfolgte anschließend bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die Extinktion einer RNA-Lösung mit einer Konzentration von 40µg/ml ergibt bei einer Wellenlänge von 260 nm den Wert 1,0. Die Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration ist bei dieser Messung linear.

Die Konzentration der RNA in [µg/µl] berechnet sich nun aus der optischen Dichte (OD) mit Hilfe des Ausdrucks:

$$\begin{aligned}\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &= \text{OD} \cdot 40 \cdot 100/1000 \\ &= \text{OD} \cdot 4\end{aligned}$$

3.2.5.1.4. Reinheit und Qualität der isolierten RNA

Eine unerlässliche Vorbedingung für die Durchführung der RT-PCR-Methode stellt die Gewinnung einer reinen und in ihrer Integrität erhaltenen RNA dar. Die Reinheit und Qualität der RNA wurde mit zwei verschiedenen Methoden untersucht:

A) Durch die Bestimmung der $A_{260/280}$ -Ratio

Diese wurde zur Abschätzung der Reinheit zusätzlich im UV-Spektrometer bestimmt, da aus diesem Quotienten auf den Reinheitsgrad der isolierten Nukleinsäurelösung geschlossen werden kann.

Im Idealfall einer reinen Nukleinsäurelösung erhält man eine $A_{260/280}$ -Ratio mit einem Wert von 2,0. Da Proteine und insbesondere ihre aromatischen Aminosäurebestandteile, wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, bei 280 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen, sinkt der Quotient bei einer Verunreinigung der Lösung mit Proteinen. Für die vorliegenden Versuche wurden ausschließlich RNA-Präparationen mit einer $A_{260/280}$ -Ratio von größer als 1,5 verwendet.

B) Durch die Gel-Elektrophorese

Auch mit dieser Methode wurde eine Qualitäts- und Reinheitskontrolle der isolierten RNA durchgeführt. Als Qualitätskriterium diente zum einen der Nachweis einer deutlich sichtbaren DNA-Bande auf dem Elektrophorese-Gel bei der molekularen Größe von 485 bp entsprechend der Größe des CK20-RT-PCR-Produktes, sowie ein Fehlen von Verunreinigungen oder DNA-Degradationsprodukten auf dem Elektrophorese-Gel. Zur Kontrolle der molekularen Größe des PCR-Produktes wurde ein molekularer DNA-Größenmarker mit auf das Elektrophorese-Gel aufgetragen.

Des weiteren wurde zur Sicherung der Integrität und Qualität der isolierten RNA das ubiquitär vorkommende Housekeeping-Gen GAPDH im ersten CK20-PCR-Zyklus koamplifiziert.

3.2.5.2. Reverse Transkription

Mit Hilfe der murinen Reversen Transkriptase des First Strand cDNA Synthesis Kit wurde die isolierte zelluläre RNA enzymatisch in zelluläre DNA (cDNA) überführt. Die Synthese der cDNA lief wie folgt ab: Zunächst erfolgte die Anlagerung eines

Hexadesoxynukleotid-Primers an den denaturierten RNA-Strang. An dieser Stelle konnte nun durch enzymatische Tätigkeit der Reversen Transkriptase ein komplementärer cDNA-Einzelstrang synthetisiert werden. Anschließend erfolgte die Synthese des zur Bildung der Doppelstrang-DNA notwendigen zweiten cDNA-Einzelstrangs mittels eines einzelnen PCR-Zyklus.

Es wurde pro RT-Ansatz 1 µg RNA eingesetzt.

Reagenzien:

- **First Strand cDNA Synthesis Kit (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien):**

Bulk First-Strand cDNA Reaction Mix:	FPLCpure Murine Reverse Transkriptase RNAguard (porcine) RNase/DNase-Free BSA dATP dCTP dGTP dTTP
DTT Solution:	200 mM
Pd(N) ₆ Primer:	0,2 µg/µl, Random hexadesoxynucleotides
RNase-freies Wasser:	Behandelt mit Diethyl-Pyrocyanat (DEPC)

RT-Ansatz (1 µg RNA):

1. RNA-Probe (1 µg) in ein e-Cup pipettieren und Zugabe von RNase-freiem Wasser zu den RNA-Proben.
2. RNA-Proben mit Volumina bis 8 µl: Mit RNase-freiem Wasser auf 8 µl auffüllen.
3. RNA-Proben mit Volumina größer 8 µl: Mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl auffüllen.

4. RNA-Probe für 10 min bei 65°C inkubieren, dann auf Eis kühlen.
5. Reaktionsansatz entsprechend Tabelle 10. Anschließend Reaktionsgemisch durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischen.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

RNA (1 µg)	Bulk First-Strand Reaction Mix	Primer	DTT Solution	Endvolumen des Reaktionsansatzes
8 µl	5 µl	1 µl	1 µl	15 µl
20 µl	11 µl	1 µl	1 µl	33 µl

6. Reaktionsgemisch für 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
7. Das cDNA-Reaktionsprodukt entweder sofort der PCR zuführen oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C tiefgefrieren.

3.2.5.3. Polymerasekettenreaktion

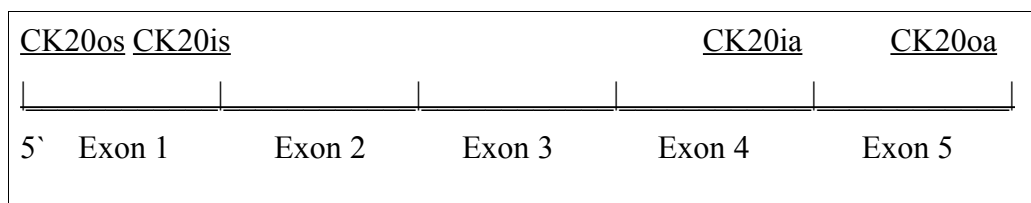
Parallel zu jeder CK20-Sequenz wurde jeweils eine cDNA-Sequenz des Housekeeping-Gens GAPDH koamplifiziert. Dazu wurde cDNA aus derselben Reversen Transkription verwendet, um so die Integrität der RNA, sowie den korrekten Ablauf der RNA-Extraktion und Reversen Transkription zu überprüfen.

Es handelte sich dabei um eine nested PCR, die aus zwei hintereinander geschalteten PCR-Zyklen bestand, und bei der zwei unterschiedliche Primerpaare eingesetzt wurden. Im ersten PCR-Zyklus wurde mit Hilfe des Primerpaares OS (outer sense) und OA (outer antisense) ein 788 Basenpaare zählendes Fragment aus der cDNA der Zytokeratin 20-Sequenz amplifiziert. Der OS-Primer lagert sich dabei an die Nukleotide 4992-5012 auf Exon 1 an, der OA-Primer an die Nukleotide 10214-10235 auf Exon 5. Im zweiten PCR-Zyklus wurde dann ein kürzeres cDNA-Fragment mit einer Länge von 485 Basenpaaren vervielfältigt, welches innerhalb des Amplifikationsproduktes des ersten Zyklus liegt. Die hierfür verwendeten Primer IS (inner sense) und IA (inner antisense) lagern sich hierbei an die Nukleotide 5074-5091 auf Exon 1 und an die Nukleotide

9832-9853 auf Exon 4 an. Durch die Anwendung der nested-PCR erfolgte somit eine direkte Kontrolle des im ersten PCR-Zyklus erhaltenen Amplifikationsproduktes.

Zur Amplifikation des cDNA-Fragmentes der GAPDH-Sequenz, welches 359 Basenpaare zählt, wurde dagegen ein einzelner PCR-Zyklus verwendet, in dem die beiden Primer GAPDH 1 und GAPDH 2 eingesetzt wurden (Soeth et al. 1996). Die Vervielfältigung der GAPDH-Sequenz wurde dabei parallel im 1. Thermozyklus für die CK20-Amplifikation durchgeführt.

Abbildung 2: Genomische Lokalisation der zur Zytokeratin 20-nested-RT-PCR eingesetzten Primer.



Äußeres Primerpaar: CK20 os = Zytokeratin 20 outer sense Primer

CK20 oa = Zytokeratin 20 outer antisense Primer

Inneres Primerpaar: CK20 is = Zytokeratin 20 inner sense Primer

CK20 ia = Zytokeratin 20 inner antisense Primer

Die Basensequenzen der verwendeten Primer sind komplementär zu bestimmten Abschnitten der Zytokeratin 20-cDNA und finden sich in Kapitel 2.1.1 auf Seite 37. Das äußere Primerpaar überspannt dabei vier, das innere Primerpaar drei Introns. Daher kann eine unspezifische Amplifikation genomischer DNA aufgrund des höheren Molekulargewichtes des Reaktionsproduktes leicht nachgewiesen werden.

Es wurde pro Probe ein PCR-Ansatz von 50 µl angesetzt und in 0,5 ml e-Cups im Thermocycler nach einem festgelegten Temperaturzyklus inkubiert.

Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen unter dem Laminar-Air-Flow statt, wobei ausschließlich sterile Einmalpipettenspitzen mit Filter, autoklavierte Arbeitsmaterialien sowie für die PCR reservierte Pipetten verwendet wurden. Die RNA-Extraktion und die Gel-Elektrophorese fanden an anderen Arbeitsplätzen statt, um eine Kontamination der PCR-Ansätze mit DNA oder RNA zu verhindern.

Das PCR-Reaktionsgemisch wurde zunächst als so genannter Master-Mix für alle Proben gemeinsam angesetzt und dann im ersten PCR-Zyklus in einer Menge von 42,5 µl zu 7,5 µl der Proben-DNA pipettiert und gut vermischt. Im zweiten PCR-Zyklus wurden 45 µl Master-Mix zu 5 µl Proben-DNA zugesetzt.

Anschließend wurden die Proben den in Tabelle 11 und Tabelle 12 aufgeführten Amplifikationszyklen im entsprechend programmierten Thermocycler zugeführt.

Die DNA-Amplifikation lief in verschiedenen Schritten ab: Zunächst fand die initiale Denaturierung der Doppelstrang-DNA bei 94°C statt. Diese lag nun als Einzelstrang-DNA vor. Anschließend wurden 30-35 Zyklen durchlaufen, die aus mehreren Phasen bestanden: Zu Beginn erfolgte die DNA-Denaturierung bei 94 °C, darauf fand die Anlagerung der Primer, das Annealing, bei 57°C im ersten und bei 62 °C im zweiten Reaktionszyklus statt. Schließlich erfolgte die Polymerisation der DNA, die Extension, bei 72 °C. Zum Schluss lief bei ebenfalls bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der relativ hitzestabilen DNA-Polymerase des Süßwasserfisches *Thermus aquaticus*, eine letzte Extension ab.

Im zweiten CK20-PCR-Zyklus wurde als DNA-Template eine 1:100 Verdünnung des DNA-Produktes aus dem ersten CK20-PCR-Zyklus verwendet.

In jedem Amplifikationszyklus wurde sowohl eine Negativ- als auch eine Positivkontrolle mit untersucht. Als Negativkontrolle wurde zum einen Buffy Coat gesunder Blutspender verwendet, der in der Blutbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf aufgearbeitet wurde, zum anderen wurde Aqua bidest. eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten Zellen der Kolon-Karzinom-Zelllinie HT 29.

Die CK20-Polymerasekettenreaktion wurde unter Verwendung der von Soeth et al. (1996) publizierten Primer durchgeführt. Die ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe verwendeten PCR-Zyklen wurden, wie in Tabelle 11 und Tabelle 12 aufgeführt, modifiziert.

Reagenzien :

GeneAmp 10x PCR Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 8,3
	500 mM KCl
	15 mM MgCl
	0,01% (w/v) Gelatine
dNTP-Mix:	1,25 mM

Primer CK20 OS
 Primer CK20 OA
 Primer CK20 IS
 Primer CK20 IA

PCR-Ansatz (50µl):1. Zyklus

GAPDH		
	7,5 µl	Template DNA
	5,0 µl	10x Puffer
	4,0 µl	dNTP-Mix (1,25 mM)
	10,0 µl	GAPDH 1
	10,0 µl	GAPDH 2
	0,3 µl	Taq Polymerase (5U/µl)
	13,2 µl	dd H ₂ O
CK20		
	7,5 µl	Template DNA
	5,0 µl	10x Puffer
	4,0 µl	dNTP-Mix (1,25 mM)
	2,5 µl	CK20 OS
	2,5 µl	CK20 OA
	0,3 µl	Taq Polymerase (5U/µl)
	29,2 µl	dd H ₂ O

2. Zyklus

CK20		
5,0 µl		Template DNA (DNA aus 1. Amplifikationszyklus 1:100 verdünnt)
5,0 µl		10x Puffer
4,0 µl		dNTP-Mix (1,25 mM)
2,0 µl		CK20 IS
2,0 µl		CK20 IA
0,3 µl		Taq Polymerase (5U/µl)
31,7 µl		dd H ₂ O

Tabelle 11: 1. Amplifikationszyklus der PCR für CK20 und Amplifikationszyklus der PCR für GAPDH

ANZAHL DER ZYKLEN	ZEITDAUER	TEMPERATUR	ARBEITSSCHRITT
1	2 min	94°C	Initiale Denaturierung
30	15 sec	94°C	Denaturierung
	15 sec	62°C	Annealing
	20 sec	72°C	Extension
1	11 min	72°C	Abschließende Extension

Tabelle 12: 2. Amplifikationszyklus der PCR für CK20

ANZAHL DER ZYKLEN	ZEITDAUER	TEMPERATUR	ARBEITSSCHRITT
1	2 min	94°C	Initiale Denaturierung
35	40 sec	94°C	Denaturierung
	1 min	57°C	Annealing
	1 min	72°C	Extension
1	5 min	72°C	Abschließende Extension

3.2.5.4. Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Gel-Elektrophorese erfolgte die Auftrennung der cDNA-Fragmente der CK20- und GAPDH-Sequenzen, die zuvor in den beiden PCR-Zyklen amplifiziert wurden.

Es wurde ein 1,5%-iges Agarose-Gel verwendet, welches wie folgt hergestellt wurde:

2,25 mg	Molecular Biology Grade Agarose
150 ml	TAE-Puffer 0,5%
10 ml	Aqua bidest.

Die Agarose wurde durch zweiminütiges Kochen in TAE-Puffer 0,5% und Aqua bidest. aufgelöst. Dann erfolgte der Zusatz von:

1,5µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)
-------	---------------------------

TAE-Puffer 50%: 242g Trisbase
 57,1 ml Eisessig
 100 ml 0,5M EDTA
 ad 1 l mit Aqua bidest auffüllen

Die Herstellung eines TAE-Puffers 0,5% erfolgte durch Verdünnung von 20ml TAE-Puffer 50% mit 1980 ml H₂O. Anschließend wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,0001 mg/ml zugesetzt, um die cDNA-Fragmente anzufärben.

Zunächst wurde jeweils ein Aliquot von 10 ml aus dem Amplifikationsprodukt des zweiten CK20-PCR-Zyklus bzw. des GAPDH-Zyklus mit 2 ml eines anfärbenden, bromphenolhaltigen Gel-Ladepuffers auf einer Mikrotiterplatte gut durchmischt. Anschließend wurden jeweils 10 ml dieser Mischung vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde ein molekularer DNA-Größenmarker (pBR322/Bsu Ri (Haelll) Marker 5) aufgetragen, der DNA-Fragmente in einer Größe von 89 bis 587 Basenpaaren enthält, so dass man anhand des Markers die spezifische Größe der DNA-Fragmente kontrollieren konnte. Anschließend wurde Spannung an das Gerät angelegt und so die Elektrophorese gestartet. Bei Verwendung der großen Elektrophoreseschlitten (20 x 20 cm) betrug die Laufzeit 60 Minuten und es wurde eine Spannung von 200V angelegt, bei Benutzung der kleinen Elektrophoreseschlitten (10 x

20 cm) lief das Gel 75 Minuten bei einer Spannung von 100 V.

Die DNA-Fragmente wurden unter ultraviolettem Licht visualisiert, mit dem Gel-Video-Dokumentationsgerät als Fotografie festgehalten und auf einer Diskette abgespeichert.

3.2.6. Methoden zur Datenanalyse

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Computersoftware Microsoft Excel und OpenOffice, die Archivierung der Daten mit Hilfe von Microsoft Access.

Für die statistische Analyse wurden der exakte Fisher-Test beim Vergleich zweier Gruppen und der Chi-Square-Test of Independence sowie der Pearson-Test beim Vergleich zweier oder mehrerer Gruppen zur Erhebung der statistischen Signifikanz verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der CK20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

4.1.1. Etablierung der RNA-Extraktion

Das erste Ziel dieser Arbeit ist es, eine möglichst sensitive und spezifische RT-PCR-Methode zum Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen in Knochenmark, Stammzellapharesen und peripherem Blut zu entwickeln.

Die Entwicklung der CK20-RT-PCR-Methode erfolgte in Anlehnung an eine 1996 von Soeth et al. publizierte Studie, in der mit Hilfe einer CK20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion Blut- und Knochenmarkproben von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren untersucht wurden.

Für die RNA-Isolierung wurden drei verschiedene Extraktionskits getestet, um dasjenige Verfahren herauszufinden, welches die Gewinnung von reinstmöglicher RNA in ausreichender Menge garantierte.

A) Roti-Quick-Kit (Fa. Roth):

Das Kit arbeitet auf der Basis von Phenol, β -Mercaptoethanol und verschiedener Puffersysteme. Es wird in der UV-Spektrometrie eine ausreichende Reinheit der isolierten RNA mit einer $A_{260/280}$ -Ratio zwischen 1,5 und 2,0 erreicht. Die Qualitätskontrolle der RNA mittels der Gel-Elektrophorese ergab jedoch sowohl für das DNA- als auch für RNA-Gel keine ausreichenden bzw. gar keine Banden für die CK20- und die GAPDH-Sequenz.

B) RNeasy Midi Kit (Fa. Qiagen):

Dieses Kit arbeitet nach dem Prinzip der selektiven Bindungseigenschaft einer Silikongel-Membran für RNA-Fragmente, die eine Länge von mehr als 200 Basenpaaren haben. In Kombination mit Zentrifugation und einem Salz-Puffer-System

wird eine Adsorption der total RNA an der Silikongel-Membran erreicht, während die kontaminierenden Elemente effektiv herausgewaschen werden. Die biologischen Proben wurden zu diesem Zweck zunächst lysiert, darauf folgte eine Homogenisierung unter denaturierenden Verhältnissen (Guanidinium-Isothiocyanate und β -Mercaptoethanol), die zu einer Inaktivierung von RNAsen führen, anschließend wurde zur Erhöhung der Bindungsfähigkeit Ethanol zugesetzt. Die Resultate ähnelten denen des Roti-Quick-Kit, UV-spektrometrisch ergab sich eine Reinheit der isolierten RNA von größer 1,7, jedoch ließen sich auch mit diesem Kit keine ausreichend reproduzierbaren CK20- bzw. GAPDH-positiven Banden auf dem DNA- und RNA-Elektrophorese-Gel darstellen.

C) RNazol-Kit (Fa. WAK-Chemie):

Bei diesem Kit wird die RNA-Isolierung auf Guanidinium-Phenol-Chloroform-Basis durchgeführt, es handelt sich dabei im Wesentlichen um eine modifizierte Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987). Mit dieser Methode konnte sowohl in der UV-Spektrometrie eine ausreichende Reinheit mit einer $A_{260}/280$ -Ratio zwischen 1,5 und 2,0, als auch in der Gel-Elektrophorese reproduzierbar positive Banden für die CK20- bzw. GAPDH-cDNA-Zielsequenz erreicht werden.

Die Ausbeute an RNA aus $2 \cdot 10^7$ mononukleären Zellen betrug zwischen 140 μ g und 15,2 mg RNA.

Im Folgenden wurde das RNazol-Kit für die Extraktion der RNA, die der CK20-RT-PCR zugeführt werden sollte, verwendet, da es im Gegensatz zu den beiden anderen Extraktionskits konstant reproduzierbare Banden in der Gel-Elektrophorese und eine ausreichende Reinheit der RNA erreichte.

Die GAPDH-Sequenz als ubiquitär vorkommendes Housekeeping-Gen wurde zur Sicherung der Integrität der extrahierten RNA neben der CK20-Sequenz koamplifiziert. Es handelt sich dabei um die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die als katalytisches Enzym an der Glykolyse beteiligt ist und somit in fast allen Geweben vorkommt. Welche molekularen Mechanismen zu der high-level-Expression von GAPDH führen, ist allerdings zurzeit noch unklar.

4.1.2. Etablierung der RT-PCR

Für die CK20-RT-PCR wurden die Original-Primer-Sequenzen aus dem Protokoll von Soeth et al. (Soeth et al. 1996), für die GAPDH-Amplifikation eine etwas abgewandelte Basenabfolge (siehe Kapitel 2.2.1.) verwendet. Die von der Arbeitsgruppe um Soeth verwendeten RT-PCR-Touch-down-Zyklen (siehe Tabelle 13) wurden zur Ergebnisoptimierung, wie in Abbildung 3 und Abbildung 4 dargestellt, modifiziert. Die Amplifikation der GAPDH-Sequenz erfolgte parallel zur CK20-Sequenz im ersten PCR-Zyklus.

Tabelle 13: CK20-RT-PCR-Protokoll verwendet von Soeth et al. 1996

<i>Schritte</i>	<i>Denaturationszeit</i>	<i>Annealing- u. Extensions- Zeit</i>		<i>Anzahl der Zyklen</i>
1	40 sec / 94 °C	2 min / 70°C		1
2	40 sec / 94 °C	1 min 55 sec / 69 °C		1
3	40 sec / 94 °C	1 min 50 sec / 68 °C		1
4	40 sec / 94 °C	1 min 45 sec / 67 °C		1
5	40 sec / 94 °C	1 min 40 sec / 66 °C		1
6	40 sec / 94 °C	1 min 35 sec / 65 °C		1
7	40 sec / 94 °C	1 min 30 sec / 64 °C		1
8	40 sec / 94 °C	1 min 25 sec / 63 °C		1
9	40 sec / 94 °C	1 min 20 sec / 62 °C		1
		<i>Annealing-Zeit</i>	<i>Extensionszeit</i>	
10-30	40 sec / 94 °C	1 min / 61 °C	1 min 30 sec / 72 °C	21
31			15 min / 72 °C	

Die Modifikation der Original-PCR-Zyklen von Soeth et al. (Soeth et al.1996) wurde durchgeführt, da sich auf dem cDNA-Elektrophorese-Gel zunächst keine konstanten CK20- und GAPDH-positiven Banden darstellen ließen.

Das im Folgenden entwickelte Protokoll für den ersten PCR-Zyklus enthält keinen Touch-down mehr, statt dessen umfasst es 30 Zyklen mit insgesamt kürzeren Denaturierungs-, Annealing- und Extensionszeiten sowie einer von Beginn an niedrigeren Annealing-Temperatur (siehe Abbildung 3).

Abbildung 3: Modifizierter 1. PCR-Zyklus

Initiale Denaturierung:	4 min / 94 °C		
Denaturierung:	1 min / 94 °C	}	30 Zyklen
Annealing:	1 min / 62 °C		
Extension:	1 min / 72 °C		
Finale Extension:	11 min / 72 °C		

Der zweite (nested) PCR-Zyklus wurde ebenfalls nicht mehr mit einem Touch-down begonnen, sondern nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Abbildung 4: Modifizierter 2. PCR-Zyklus

Initiale Denaturierung:	2 min / 94 °C		
Denaturierung:	40 sec / 94 °C	}	35 Zyklen
Annealing:	1 min / 57 °		
Extension:	1 min / 72 °C		
Finale Extension:	5 min / 72 °C		

Mit diesen veränderten Thermozyklen waren sowohl für die CK20- als auch für die GAPDH-Sequenz deutlich sichtbare und reproduzierbare cDNA-Banden auf dem Elektrophorese-Gel darstellbar.

4.2. Sensitivität der CK20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Zur Bestimmung der Sensitivität der neu etablierten CK20-RT-PCR wurde diese auf definierte Verdünnungsreihen angewendet. Dabei wurden jeweils mononukleäre Zellen (MNC) aus Knochenmark- und Blutstammzellproben gesunder Spender mit Karzinomzellen der Zelllinien HT29 (Kolonkarzinom) sowie MCF7 und MDA-MB-453 (Mammakarzinom) in abnehmenden Konzentrationen von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} versetzt. Als Negativkontrollen wurden zum einen die bereits zur Verdünnung genutzten MNC der gesunden Spender ohne Zusatz von Tumorzellen, zum anderen bidestilliertes Wasser verwendet. Als Positivkontrolle dienten die unverdünnten Karzinomzellen HT29, MCF7 bzw MDA-MB-453. Es werden pro Verdünnungsstufe $2 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt.

Zur Kontrolle der Integrität der RNA wurde die Sequenz des Housekeeping-Gens GAPDH im ersten PCR-Zyklus parallel zur CK20-Sequenz koamplifiziert.

Auch die Reinheit der RNA wurde photometrisch mit Hilfe der $A_{260/280}$ - und der $A_{280/260}$ -Ratio bestimmt.

Die Kolonkarzinomzelllinie HT29 wurde ebenfalls getestet, weil zuvor bereits andere Arbeitsgruppen mit ihrer PCR-Methode an dieser Zelllinie zuverlässig einen positiven CK20-Nachweis erbringen konnten (Burchill et al. 1995, Soeth et al. 1996).

Insgesamt wurden neun Verdünnungsreihen mit Zellen der Linie HT29 angefertigt. In drei der untersuchten Proben konnte ein Nachweis der Kolonkarzinomzellen anhand der CK20-positiven Elektrophoresebanden bis zu einer maximalen Verdünnung von $1 \cdot 10^{-7}$ erreicht werden, das entspricht der Detektion von einer Karzinomzelle in 10 000 000 mononukleären Zellen. Im Mittel ließen sich die Tumorzellen bis zu einer Verdünnung von $1,5 \cdot 10^{-5}$ (= 0,000015%) nachweisen.

Die in den einzelnen Verdünnungsreihen mit HT29 erreichten Sensitivitäten sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Bei der Untersuchung der Mammakarzinomlinien MCF7 und MDA-MB-453 zeigten sich deutlich niedrigere Sensitivitäten. Für die Verdünnung der MCF7-Zellen fand sich in einer Verdünnungsreihe noch bei einer Konzentration von 10^{-5} ein CK20-positives PCR-Signal, für die Verdünnung der MDA-MB-453-Zellen waren positive Banden bis zu einer minimalen Konzentration von 10^{-4} nachweisbar. Die Nachweisgrenzen für

MCF7 und MDA-MB-453 lagen im Mittel bei Verdünnungsstufen von $2,6 \cdot 10^{-3}$ bzw. $6,9 \cdot 10^{-3}$ (Ergebnisse der einzelnen Verdünnungsreihen siehe Tabelle 14).

Somit lässt sich anhand der Verdünnungsreihen für die CK20-RT-PCR eine maximale Sensitivität von $1 \cdot 10^7$ ableiten.

Tabelle 14: Sensitivität der CK20-RT-PCR: Anzahl der Verdünnungsreihen für HT29, MCF7 und MDA-MB-453, die bei einer bestimmten Verdünnungsstufe noch ein positives PCR-Signal aufweisen. Angegeben ist immer die maximal erreichte Verdünnungsstufe der einzelnen Verdünnungsreihen.

Verdünnungsstufe	HT29	MCF-7	MDA-MB-453
10^{-2}		1	4
10^{-3}			1
10^{-4}	1	2	1
10^{-5}	3	1	
10^{-6}	2		
10^{-7}	3		

Für die drei Zelllinien HT29, MCF-7 und MDA-MB-453 sind unterschiedliche Nachweisgrenzen ermittelt worden, die einander in Tabelle 15 gegenüber gestellt sind.

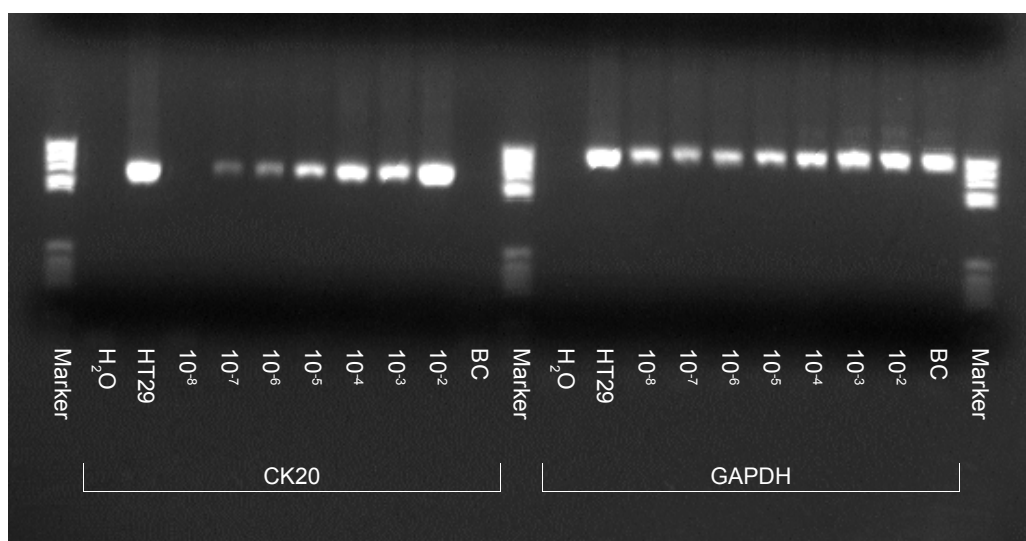
Tabelle 15 : Mittlere, mediane und maximale Nachweisgrenzen, sowie Nachweisbereich der Zelllinien HT29, MCF-7 und MDA-MB-453 in den Verdünnungsreihen

Nachweisgrenzen	HT29	MCF-7	MDA-MB-453
Mittel	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$6,9 \cdot 10^{-3}$
Median	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-2}$
Maximal	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$
Bereich	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-4}$

In Abbildung 5 sind exemplarisch Amplifikationsprodukte einer Verdünnungsreihe der Zelllinie HT29 in mononukleären Zellen dargestellt. Bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-7} lässt sich ein positives Signal für die CK20-cDNA nachweisen, in der

Verdünnungsstufe 10^{-8} ist die Zielsequenz nicht mehr nachweisbar. Als Positivkontrolle wurden HT29-Zellen, als Negativkontrollen mononukleäre Zellen und bidestilliertes Wasser verwendet. Zusätzlich wird die GAPDH-Sequenz koamplifiziert, um die Integrität der RNA, die bei der Extraktion aus der mononukleären Zellfraktion gewonnen wurde, zu überprüfen. Hier stellen sich, wie erwartet, alle Banden mit Ausnahme der Negativkontrolle positiv dar.

Abbildung 5: Elektrophorese-Gel HT29-Verdünnungsreihe (positive Banden bis 10^{-7})



4.3. Untersuchung von Knochenmark-, Stammzellapharese- und peripheren Blutproben von Mammakarzinompatientinnen sowie von einer Kontrollgruppe ohne Mammakarzinom mit Hilfe der CK20-RT-PCR

Bei allen PCR-Untersuchungen wurden für einen PCR-Probenansatz $2 \cdot 10^7$ mononukleäre Zellen eingesetzt, die aus den hämatologischen Proben von Mammakarzinompatientinnen oder Kontrollpersonen stammen.

4.3.1. Mammakarzinompatientinnen

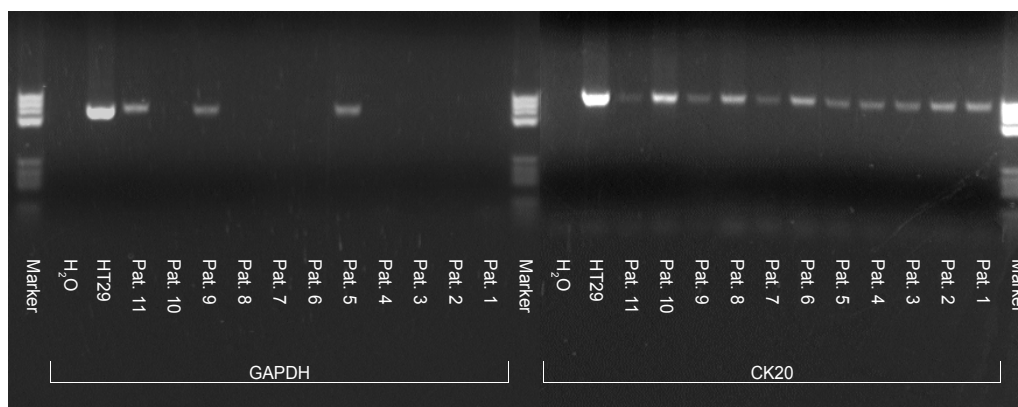
Um die Methode auf ihre klinische Anwendbarkeit zu überprüfen, wurden insgesamt 88 Knochenmark-, Blut- oder Leukaphereseproben von Hochrisiko-Patientinnen mit Mammakarzinom mit der CK20-RT-PCR untersucht. Alle Patientinnen befanden sich in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, 46 der Patientinnen wiesen einen positiven Lymphknotenstatus auf, 8 litten an einem inflammatorischen Mammakarzinom und 20 befanden sich bereits im Stadium der Fernmetastasierung. Bei 14 Patientinnen lagen keine Angaben zum Stadium der Brustkrebserkrankung vor, jedoch müssen auch sie sich in einem fortgeschrittenen Stadium befunden haben, da die Stammzell- bzw. Knochenmarkentnahme vor oder nach autologer Progenitorzelltransplantation durchgeführt wurde. Alle Mammakarzinompatientinnen wären also potentiell geeignete Kandidatinnen für eine Hochdosischemotherapie mit autologer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation, so dass sie ein Patientenkollektiv darstellen, bei dem eine Untersuchung auf disseminierte Tumorzellen auch im klinischen Alltag sinnvoll wäre. Von den Patientinnen standen jeweils unterschiedliche hämatologische Spezimen zur Verfügung. Im Einzelnen wurden 28 Knochenmarkproben, 35 Leukapheresen und 25 periphere Blutproben mittels RT-PCR hinsichtlich eines CK20-Nachweises untersucht. Die PCR-Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: CK20-RT-PCR-Ergebnisse der Proben von Hochrisikopatienten mit Mammakarzinom

Mammakarzinom	CK20 positiv	CK20 negativ	Proben-anzahl	Positiv in %
Nodal positiv:				
Knochenmark	1	14	15	7
Leukapherese	1	15	16	6
Peripheres Blut	0	15	15	0
Inflammatorisch:				
Knochenmark	0	1	1	0
Leukapherese	1	4	5	20
Peripheres Blut	0	2	2	0
Metastasiert:				
Knochenmark	2	3	5	40
Leukapherese	2	9	11	18
Peripheres Blut	0	4	4	0
Ohne nähere Angaben:				
Knochenmark	1	6	7	14
Leukapherese	0	3	3	0
Peripheres Blut	0	4	4	0
Insgesamt	8	80	88	9

In Abbildung 6 sind exemplarisch Amplifikationsprodukte der CK20- sowie GAPDH-PCR aus den Proben verschiedener Hochrisiko-Patientinnen mit Mammakarzinom abgebildet. Bei drei der Proben ließ sich in der Gel-Elektrophorese ein positives Signal für die CK20-cDNA nachweisen (Pat. 5, 9 und 11). In den Proben der übrigen Patientinnen, war die Zielsequenz nicht nachweisbar. Als Positivkontrolle wurden HT29-Zellen, als Negativkontrolle bidestilliertes Wasser verwendet.

Abbildung 6 : Elektrophorese-Gel von Mammakarzinompatienten-Proben vom 05.08.99



Insgesamt wiesen 8 von 88 Mammakarzinompatientinnen einen CK20-positiven Befund auf, entsprechend einer Tumorzellkontamination von 9% der hämatologischen Spezimen der Patientinnen, in den übrigen 91% der Proben ließen sich keine CK20-Banden nachweisen.

Im Folgenden galt es festzustellen, inwieweit das Stadium der Tumorerkrankung und die Art des untersuchten Blutproduktes Einfluss auf die Häufigkeit eines positiven CK20-Befundes haben.

Aus Tabelle 17 geht hervor, dass Patientinnen im Tumorstadium IV mit Fernmetastasierung in 20% der Fälle einen CK20-positiven Befund aufweisen, gegenüber lediglich 4% und 13% der Fälle mit nodal positivem bzw. inflammatorischem Mammakarzinom. Die Patientinnen dieser beiden Untergruppen befanden sich im Tumorstadium II oder III, für diese Stadien ergibt sich zusammengenommen ein positives PCR-Ergebnis in 6% der Fälle. Wie zu erwarten, war also die Tumorzellkontamination unter den Patientinnen mit Fernmetastasierung, also mit dem am weitesten fortgeschrittenen Tumorstadium, am höchsten. Dieses Ergebnis erreicht jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,055$, exakter Fisher-Test).

In Tabelle 18 werden die prozentualen Häufigkeiten eines positiven CK20-Befundes in Knochenmark, Leukapheresen und peripherem Blut dargestellt. Während sich in Knochenmark und mobilisierten Stammzellen mit 14% und 11% etwa gleich häufig CK20-positive Zellen fanden, ließen sich in den peripheren Blutproben keine kontaminierenden Zellen nachweisen.

Tabelle 17: CK20-RT-PCR-Ergebnisse von Mammakarzinompatientinnen, untergliedert nach unterschiedlichen Tumorstadien

	Keine näheren Angaben	Nodal positiv	Inflamma- torisch	Metasta- siert	Insgesamt
CK20 positiv	1	2	1	4	8
CK20 negativ	13	44	7	16	80
Insgesamt	14	46	8	20	88
Positiv in %	7	4	13	20	9

Tabelle 18: CK20-RT-PCR-Ergebnisse der Mammakarzinompatientinnen, untergliedert nach unterschiedlichen hämatologischen Spezimen

	KM	LP	PB	Insgesamt
CK20 positiv	4	4	0	8
CK20 negativ	24	31	25	80
Insgesamt	28	35	25	88
Positiv in %	14	11	0	9

4.3.2. Kontrollkollektiv

Um die Spezifität der CK20-RT-PCR hinsichtlich des selektiven Nachweises epithelialer Zellen zu überprüfen, wurden die hämatologischen Proben eines Kontrollkollektives, das 56 Personen umfasst, unter den gleichen methodischen Bedingungen wie die Proben der Mammakarzinompatientinnen mit der CK20-PCR untersucht.

Diese Kontrollgruppe besteht aus Personen ohne epitheliale Tumorerkrankung und setzt sich aus 14 gesunden Spendern, 36 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen (5 mit Plasmozytom, 18 mit AML, 3 mit ALL, 9 mit CML, 1 mit Myelodysplastischem Syndrom), 3 Patienten mit Lymphom (1 mit M. Hodgkin, 2 mit Non-Hodgkin-

Lymphom) und 3 Patienten mit Sarkom (1 mit Ewing-Sarkom, 2 mit Fibrosarkom) zusammen.

Insgesamt fand sich bei 14% aller Kontrollpersonen ein positives PCR-Ergebnis. Der höchste Anteil an Proben mit CK20-positiven Banden fand sich mit 19% bei den Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, die Proben der gesunden Spender waren ebenfalls in 7% der Fälle CK20-positiv. In den Untergruppen der Lymphom- und Sarkompatienten ließ sich dagegen keine CK20-Expression nachweisen, allerdings handelte es sich hier auch um eine sehr geringe Anzahl von untersuchten Patienten.

Untergliedert man die Kontrollgruppe nach der Art der entnommenen hämatologischen Spezimen, so lässt sich feststellen, dass die peripheren Blutproben mit 31% am häufigsten einen CK20-positiven Befund aufweisen, gefolgt von den Knochenmark-Aspiraten mit 11% und den Leukaphereseprodukten mit 7%.

Die Ergebnisse der CK20-RT-PCR werden untergliedert nach den unterschiedlichen Erkrankungen der Kontrollpersonen bzw. nach den verschiedenen hämatologischen Spezimen in Tabelle 19 und Tabelle 20 dargestellt.

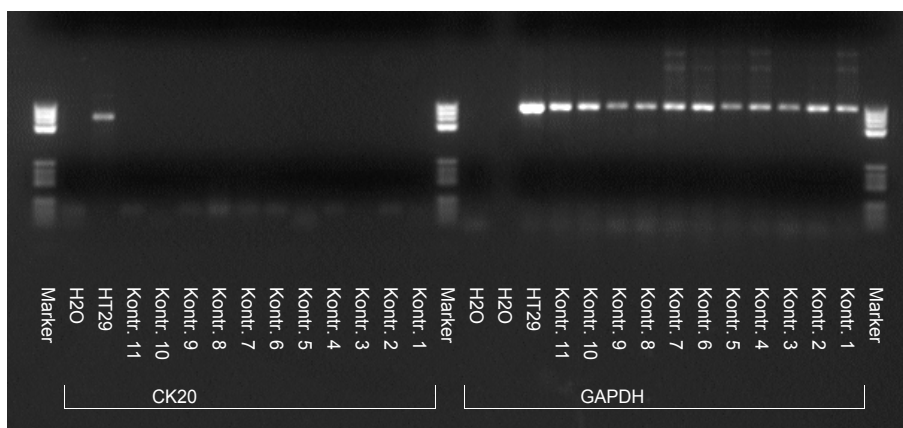
Tabelle 19: CK20-RT-PCR-Ergebnisse der Kontrollpersonen, untergliedert nach unterschiedlichen Erkrankungen

	Gesunde Spender	Hämatolog. Erkr.	Lymphome	Sarkome	Insgesamt
CK20 positiv	1	7	0	0	8
CK20 negativ	13	29	3	3	48
Insgesamt	14	36	3	3	56
Positiv in %	7	19	0	0	14

Tabelle 20: CK20-RT-PCR-Ergebnisse der Kontrollpersonen, untergliedert nach der Herkunft der Proben

	KM	LP	PB	Insgesamt
CK20 positiv	3	1	4	8
CK20 negativ	25	14	9	48
Insgesamt	28	15	13	56
Positiv in %	11	7	31	14

Abbildung 7: Elektrophorese-Gel der Negativkontrollen vom 28.12.1999



Beispielhaft ist in Abbildung 7 ein DNA-Gel mit Proben der Kontrollgruppe ohne epitheliale Tumorerkrankung dargestellt. Die Proben zeigen, wie erwartet, für die CK20-RT-PCR einen negativen Befund, für die zur Kontrolle mitgeführte GAPDH-RT-PCR und die Positivkontrolle mit HT29 dagegen ein positives Ergebnis.

4.3.3. Vergleich der Ergebnisse von Mammakarzinompatientinnen und Kontrollpersonen

Bei den Mammakarzinompatientinnen findet sich in nur 9% der Fälle ein positiver PCR-Befund. Dieses Ergebnis könnte man damit erklären, dass nur bei einem geringen Anteil der Patientinnen bereits eine Tumorzellabsiedlung ins Knochenmark oder Blut stattgefunden hat.

Dem gegenüber findet sich eine relativ hohe Anzahl von 14% an positiven PCR-Ergebnissen in der Kontrollgruppe ohne epitheliale Tumorerkrankung, die auf den ersten Blick unverständlich ist.

Beim Vergleich der Proben unterschiedlicher Blutkompartimente in den beiden Patientengruppen fällt auf, dass sich bei den Mammakarzinompatientinnen die meisten positiven Befunde in den Knochenmarkaspiraten finden, jedoch keine im peripheren Blut. Dagegen weisen in der Kontrollgruppe die peripheren Blutproben die höchste Anzahl an CK20-Banden auf.

4.3.4. Verfahren zur Separation der mononukleären Zellfraktion

Zur Separation der mononukleären Zellfraktion aus dem Probenmaterial wurde zum einen die Erylyse mittels Ammonium-Chlorid zum anderen die Ficoll-Gradienten-Zentrifugation verwendet. Es erfolgte eine Quasi-Randomisierung der Patientenproben, diese wurden je nach der Menge des zur Verfügung stehenden Probenmaterials auf die beiden Separationsverfahren verteilt. Dabei wurden Proben, deren Volumen weniger als 5 ml betrug, der Erylyse, Proben, die ein Volumen von mehr als 5ml besaßen, der Ficoll-Gradienten-Separation zugeführt. Um festzustellen, ob das Separationsverfahren einen Einfluss auf die Anzahl der positiven RT-PCR-Befunde hat, wurden die PCR-Ergebnisse der mit Erylyse bzw. Ficoll-Gradienten-Separation gewonnenen MNC-Fraktionen einander gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Anzahl und PCR-Ergebnis der Proben von Mammakarzinompatientinnen und der Kontrollpersonen, bei denen die mononukleäre Zellfraktion mittels Erylyse respektive Ficoll-Gradienten-Separation gewonnen wurde.

PCR-Ergebnis	Erylyse		Ficoll-Gradienten-Separation	
	Mamma-karzinom-patientinnen	Kontroll-gruppe	Mamma-karzinom-patientinnen	Kontroll-gruppe
CK20-negativ	78	47	2	1
CK20-positiv	8	8	0	0
Positiv in %	10	17	0	0

Insgesamt wurden 3 Proben mittels Ficoll-Separation dagegen 141 Proben mit der Erylyse bearbeitet. Es findet sich in den mittels Ficoll-Separation bearbeiteten Proben kein positiver PCR-Befund, während die mit der Erylyse gewonnenen MNC der Mammakarzinomproben in 10%, die der Kontrollgruppe in 17% ein positives PCR-Ergebnis aufweisen.

Da in der überwiegenden Anzahl der Proben die Erylyse zur Gewinnung der MNC verwendet wurde, kann aus den Befunden jedoch keine signifikante Schlussfolgerung gezogen werden.

4.4. Vergleich von Polymerasekettenreaktion und Immunzytologie

Von den 88 Mammakarzinompatienten-Proben, die mit der CK20-RT-PCR-Methode untersucht wurden, wurden 66 der Proben parallel zusätzlich mit Hilfe der Mammaglobin-RT-PCR sowie mit der Methode der Immunzytologie auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise von Frau Birte Detlefsen und Frau Chonda Datta zur Verfügung gestellt. Aufgrund der begrenzten Mengen an Probenmaterial und damit an mononukleären Zellen war dies nicht für alle 88 Versuchsansätze möglich.

Die Ergebnisse der CK20-RT-PCR und der Immunzytologie sind einander in Tabelle 22 gegenübergestellt.

Tabelle 22: Vergleich von CK20-RT-PCR und Immunzytologie. Bei insgesamt 66 der Mammakarzinompatienten-Proben wurde der Nachweis disseminierter Tumorzellen mit beiden Verfahren parallel durchgeführt.

CK20-RT-PCR	Immunzytologie	
	positiv	negativ
positiv	2	6
negativ	8	50

Es zeigte sich in 78,8% der Fälle (52 Proben) ein übereinstimmendes Ergebnis, wobei in 2 Fällen ein positiver, in 50 Fällen ein negativer Tumorzellnachweis geführt wurde.

Bei 6 Proben (10,0%) zeigte sich in der CK20-RT-PCR ein positives Ergebnis, während die Immunzytochemie einen negativen Befund ergab. In 8 Fällen (12,1%) wies die Immunzytologie einen positiven Tumorzellnachweis bei negativem PCR-Ergebnis auf. Die CK20-RT-PCR und die Immunzytologie erreichten im Nachweis von Mammakarzinomzellen in den Patientenproben keine statistisch signifikante Übereinstimmung nach dem Pearson-Test ($p = 0,41$).

Zusätzlich wurden die gleichen 66 Mammakarzinompatienten-Proben parallel mit einer weiteren PCR-Methode untersucht, die als Ziel-DNA-Sequenz Mammaglobin (MG) verwendet, ein Oberflächenprotein, welches weitgehend selektiv auf

Mammakarzinomzellen vorkommt. Die Ergebnisse der beiden PCR-Methoden sind vergleichend in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Vergleich von CK20-RT-PCR und Mammaglobin-RT-PCR. Bei insgesamt 66 der Mammakarzinompatienten-Proben wurde der Nachweis disseminierter Tumorzellen mit beiden Verfahren parallel durchgeführt.

<i>CK20-RT-PCR</i>	<i>MG-RT-PCR</i>	
	positiv	negativ
positiv	3	5
negativ	17	41

Die beiden PCR-Methoden wiesen in 66,7% der Fälle (44 Proben) ein übereinstimmendes Ergebnis auf, wobei in 3 Fällen (4,6%) ein Tumorzellnachweis möglich war, während in 41 Fällen (62,1%) das Ergebnis negativ ausfiel. In 5 Fällen ergab die CK20-RT-PCR einen positiven Befund, während die MG-RT-PCR negativ ausfiel. Dagegen gelang in 17 Patientenproben ein positiver Tumorzellnachweis mit Hilfe der MG-RT-PCR, bei negativem CK20-RT-PCR-Befund. Leider ergab sich auch für die beiden PCR-Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen nach dem Pearson-Test keine statistisch signifikante Übereinstimmung ($p = 0,64$).

Vergleicht man die Ergebnisse aller drei Methoden nach der Untersuchung der 66 Mammakarzinompatienten-Proben, so kommt man in immerhin 56,0% (37 Proben) zu übereinstimmenden Befunden. Davon konnte in einem Fall (1,5%) ein positiver, in 36 Fällen (54,5%) ein negativer Tumorzellnachweis für alle drei Verfahren geführt werden.

4.5. CK20-RT-PCR-Ergebnisse vor und nach Zytokin-Stimulation

Aufgrund der relativ hohen Anzahl CK20-positiver PCR-Ergebnisse in der Kontrollgruppe lag es nahe, genauer zu beleuchten, welche Einflussfaktoren zu diesen

Befunden führen könnten. Im Folgenden wurde der Einfluss einer Stimulation mit verschiedenen Zytokinen auf die Zytokeratin 20-Transkription in unterschiedlichen Zelllinien myeloiden, lymphoiden oder fibroblastären Ursprungs sowie in hämatopoetischen Zellen von Patienten ohne epitheliale Tumorerkrankung mit Hilfe der RT-PCR untersucht.

Die Stimulation wurde mit neun unterschiedlichen Zytokinen durchgeführt (siehe auch Tabelle 5):

- IL-3 (Interleukin 3)
- IL-6 (Interleukin 6)
- IL-1 β (Interleukin 1 β)
- TPO (Thrombopoetin)
- flt3-Ligand (Ligand des Thyrosinkinase 3-Rezeptor)
- SCF (Stem Cell Factor)
- G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)
- GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor)
- INF- γ (Interferon- γ)

Zur Kontrolle wurden auch Proben jeder Zelllinie und jeder Patientenprobe ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren kultiviert.

Dazu wurden von jeder Zelllinie und jeder Patientenprobe $2 \cdot 10^7$ Zellen pro Kulturflasche gemeinsam mit einer definierten Menge des jeweiligen Zytokins (siehe Tabelle 5) bzw. ohne Zytokinzusatz für 7 Tage in Zellkultur genommen und danach der CK20-RT-PCR zugeführt.

4.5.1. Verschiedene Zelllinien

Es wurden im folgenden 6 verschiedene Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs bzw. einer hämatologischen Grunderkrankung (siehe auch Tabelle 5) untersucht:

K-562:	CML Blastenkrise
U937:	histiozytäres Lymphom
HL-60:	Promyelozytische Leukämie
TF 1:	Akute Erythroleukämie
Raji:	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
Fibroblasten:	Primäre Zellen

Diese wurden in insgesamt 166 Zellkulturflaschen mit 9 unterschiedlichen Zytokinen (siehe Tabelle 3) über 7 Tage stimuliert.

Die meisten CK20-positiven Ergebnisse wurden in der Zelllinie K562 beobachtet, in dieser Zelllinie wiesen 11 der 36 untersuchten Proben (=31%) einen positiven PCR-Befund auf. Unter den CK20-positiven Proben befanden sich sowohl Proben mit als auch ohne zusätzliche Zytokin-Stimulation, im Einzelnen waren 4 von 9 Proben (=44%) ohne Zytokin-Stimulation sowie 7 von 27 Proben (=26%) mit Zytokin-Stimulation positiv. Somit ist festzuhalten, dass eine zusätzliche Stimulation der Zellen der Linie K562 mit Zytokinen nicht zu einem vermehrten Nachweis des CK20-PCR-Transkriptes führte.

In den anderen fünf Zelllinien verschiedenen Ursprungs konnte bis auf zwei Ausnahmen sowohl mit als auch ohne Zytokin-Stimulation keine CK20-Transkription nachgewiesen werden. Nur in jeweils einer Probe der Zelllinien einer promyelozytischen Leukämie HL60 und eines B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms Raji konnte nach Stimulation mit dem Zytokin flt3-Ligand ein positiver CK20-PCR-Befund erhoben werden. Flt3-Ligand ist der Ligand für den Thyrosin-Kinase3-Rezeptor, der zuerst in fetalen Leberzellen entdeckt wurde. Es wurde gezeigt, dass der flt3-Ligand die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von humanen, hämatopoetischen Progenitorzellen stimuliert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in den untersuchten Zelllinien durch eine Stimulation mit Zytokinen keine vermehrte Expression von CK20 erreicht werden konnte. Der Chi-Square-Test erreichte in keinem der Fälle eine statistische Signifikanz. Für die Zelllinie K562 konnte dagegen im Vergleich zu den anderen getesteten Zelllinien eine signifikant höhere CK20-Expression festgestellt werden ($p < 0,01$).

4.5.2. Patientenproben

Es wurden die Leukaphereseprodukte bzw. Knochenmarkaspirate von einer Gruppe von 22 Personen ohne epitheliales Malignom untersucht, die sich aus 6 gesunden Spendern, 13 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen (3 Plasmozytome, 6 akute Leukämien, 2 chronisch myeloische Leukämien, 1 Non-Hodgkin-Lymphom, 1 Myelodysplastisches Syndrom) und 3 Sarkompatienten zusammensetzte.

Die Stammzellprodukte dieser Patienten wurden in einer Gesamtzahl von 170 Zellkulturflaschen über 7 Tage in Kultur genommen und mit den in Tabelle 5

aufgelisteten 9 Zytokinen stimuliert. Pro Zellkulturansatz wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen verwendet, nach 7 Tagen Zellkultur wurden ebenfalls $2 \cdot 10^7$ Zellen aus jeder Kulturflasche der CK20-RT-PCR zugeführt.

Viele der Patientenproben konnten nicht mit allen 9 Zytokinen stimuliert werden, da in einigen Fällen die Zellmenge des Probenmaterials zu gering war, so dass bei 19 von 22 Patientenproben nur eine Auswahl von Zytokinen getestet werden konnte. Nur in 3 Fällen reichte das Probenmaterial für eine Stimulation mit allen 9 Zytokinen.

Auch bei den Patientenproben führte die zusätzliche Stimulation des kultivierten Probenmaterials mit den verschiedenen Zytokinen zu keiner signifikanten Zunahme der CK20-Expression. Die Patientenproben, die ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren in Kultur genommen worden waren, wiesen in 10% der Fälle einen CK20-positiven PCR-Befund auf gegenüber 11% der stimulierten Proben. Der höchste Anteil C20-positiver PCR-Banden fand sich mit 23% nach Stimulation mit den Zytokin IL6. Nach Kultivierung der Patientenproben mit IL1- β zeigten sich in 20%, mit TPO in 16% und mit G-CSF in 13% ein positives PCR-Ergebnis. Die Stimulation der Proben mit den übrigen Zytokinen ergab in 0 - 9% einen CK20-positiven Befund. Unterschiede in der Häufigkeit eines positiven PCR-Befundes zwischen nicht stimulierten Proben und jedes einzelnen Stimulationsansatzes wurden mit Hilfe des Chi-Square-Tests ermittelt, es ergab sich jedoch in keinem der Fälle ein statistisch signifikanter Unterschied.

Des Weiteren bestand kein Unterschied darin, um welches Blutprodukt es sich bei den untersuchten Patientenproben handelte. Die Anzahl der positiven Befunde im Knochenmark unterschied sich nicht wesentlich von der in den Leukaphereseprodukten.

Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 24 und Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 24: CK20-RT-PCR-Ergebnisse verschiedener Zelllinien ohne und nach Zytokinstimulation über 7 Tage. Die Anzahl der positiven PCR-Ergebnisse sind in Prozent angegeben, zur Ermittlung der Signifikanz wurde der Chi-Square-Test verwendet.

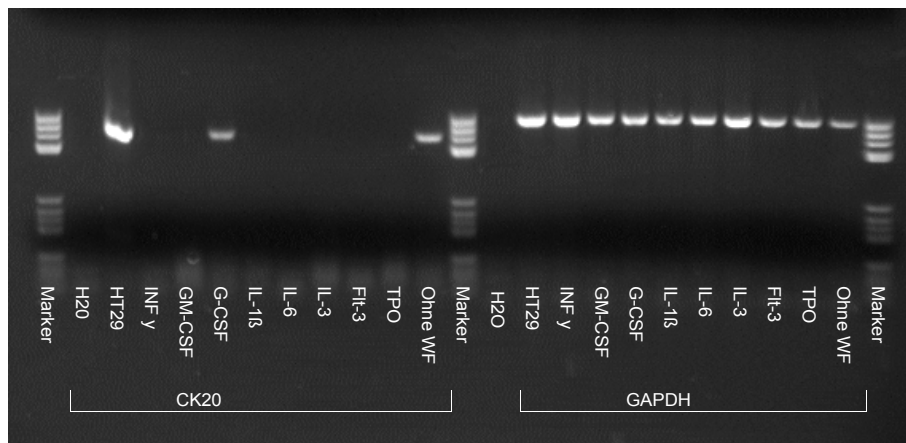
Zytokine	CK20	Zelllinien						%	p-value
		Fibrobl.	HL60	K562	Raji	TF1	U937		
Ohne WF	pos.	0	0	4	0	0	0	11	
	neg.	4	6	5	7	6	8	89	
IL3	pos.	0	0	1	0	0	0	7	0,52
	neg.	2	3	2	2	2	2	93	
IL6	pos.	0	0	0	0	0	0	0	0,14
	neg.	2	3	3	2	2	2	100	
Il-1 β	pos.	0	0	2	0	0	0	14	0,95
	neg.	2	3	1	2	2	2	86	
SCF	pos.	0	0	0	0	0	0	0	0,14
	neg.	2	3	3	2	2	2	100	
INF γ	pos.	0	0	1	0	0	0	7	0,52
	neg.	2	3	2	2	2	2	93	
FLT3	pos.	0	1	0	1	0	0	14	0,95
	neg.	2	2	3	1	2	2	86	
TPO	pos.	0	0	1	0	0	0	7	0,52
	neg.	2	3	2	2	2	2	93	
G-CSF	pos.	0	0	1	0	0	0	7	0,52
	neg.	2	3	2	2	2	2	93	
GM-CSF	pos.	0	0	1	0	0	0	7	0,52
	neg.	2	3	2	2	2	2	93	

Tabelle 25: CK20-RT-PCR-Ergebnisse verschiedener Proben von Patienten ohne Mammakarzinom ohne und nach Zytokinstimulation über 7 Tage. Die Anzahl der positiven PCR-Ergebnisse sind in Prozent angegeben, zur Ermittlung der Signifikanz wurde der Chi-Square-Test verwendet.

Zytokine	CK20	Patienten							%	p-value
		Gesund	Plasmoz	AML, ALL	CML	NHL	MDS	Sarkom		
Ohne WF	pos.	0	0	2	0	0	0	0	10	
	neg.	6	3	4	2	1	1	3	90	
IL3	pos.	0	0	0	0	1	0	0	6	0,67
	neg.	5	3	4	2	0	1	2	94	
IL6	pos.	1	0	2	1	0	0	0	23	0,25
	neg.	3	2	4	1	1	1	2	77	
Il-1β	pos.	2	0	1	0	0	0	0	20	0,38
	neg.	3	2	3	1	0	1	3	80	
SCF	pos.	0	0	0	0	0	0	0	0	0,27
	neg.	4	1	2	2	1	1	2	100	
INFγ	pos.	0	0	1	0	0	0	0	9	0,94
	neg.	3	2	2	1	0	1	2	91	
FLT3	pos.	0	0	0	1	0	0	0	6	0,64
	neg.	5	2	5	1	1	1	3	94	
TPO	pos.	1	0	1	0	1	0	0	16	0,55
	neg.	4	3	4	2	0	1	3	84	
G-CSF	pos.	0	0	2	0	0	0	0	13	0,74
	neg.	3	2	2	2	1	1	3	87	
GM-CSF	pos.	0	0	0	0	0	0	0	0	0,22
	neg.	4	2	4	2	1	1	2	100	

Aufgrund der teilweise zu geringen Zellzahl in den Zelllinien und Patientenproben konnten nicht alle Proben mit allen Zytokinen stimuliert werden.

Abbildung 8: Elektrophorese-Gel von der stimulierten LP eines gesunden Fremdspenders vom 10.12.99



WF = Wachstumsfaktoren/Zytokine

In Abbildung 8 sind exemplarisch Amplifikationsprodukte der CK20- sowie GAPDH-PCR aus der Leukapherese eines Patienten mit AML vor (= ohne WF) und nach Stimulation mit den 9 verschiedenen Zytokinen abgebildet. Bei zwei der Leukapherese-Aliquots ließ sich in der Gel-Elektrophorese ein positives Signal für die CK20-cDNA nachweisen. Es handelte sich um das mit G-CSF stimulierte Aliquot, sowie die ohne Zytokinzusatz kultivierte Probe. In den übrigen Leukapherese-Ansätzen ließ sich die Zielsequenz nicht nachweisen. Als Positivkontrolle wurden HT29-Zellen, als Negativkontrolle bidestilliertes Wasser verwendet. Zusätzlich wurde die GAPDH-Sequenz koamplifiziert, um die Integrität der RNA, die bei der Extraktion aus der mononukleären Zellfraktion gewonnen wurde, zu überprüfen. Hier stellten sich, wie erwartet, alle Banden mit Ausnahme der Negativkontrolle positiv dar.

5. Diskussion

Der Nachweis von Minimal Residual Disease hat bei Mammakarzinompatientinnen in fortgeschrittenem Tumorstadium, die mit einer Hochdosischemotherapie und nachfolgender Knochenmark- oder Stammzelltransplantation behandelt werden, zunehmend an Bedeutung gewonnen. Retrospektive Studien und Genmarkierungsexperimente, die für andere Tumorerkrankungen bereits durchgeführt wurden, legten die Vermutung nahe, dass von reinfundierten Stammzellprodukten, die mit Tumorzellen kontaminiert sind, eine Rezidivgefahr ausgeht (Radich 1999, San Miguel et al. 1997, Radich et al. 1997, Deisseroth et al. 1994, Brenner et al. 1993, Rill et al. 1994). Daher ist die Entwicklung hochsensitiver und -spezifischer Nachweisverfahren für disseminierte Tumorzellen von größter Bedeutung. In ersten Studien ist die Zytokeratin 20-RT-PCR als hochspezifische molekulare Nachweismethode für gastrointestinale Tumoren beschrieben worden (Soeth et al. 1996, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Soeth et al. (1996, 1997) verwendete CK20-RT-PCR-Methode für den Nachweis disseminierter Mammakarzinomzellen optimiert, da sich bei Verwendung des Originalprotokolls von Soeth in der cDNA-Gelelektrophorese keine konstanten CK20- und GAPDH-positiven Banden darstellen ließen.

Zunächst galt es, ein Verfahren für die RNA-Isolierung zu finden, das die Gewinnung von möglichst reiner RNA in ausreichender Menge sicherstellte. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Extraktionskits ausgetestet, im Einzelnen das Roti-Quick-Kit (Fa. Roth), das RNeasy Midi Kit (Fa. Qiagen) und das RNazol-Kit (Fa. WAK-Chemie). Sowohl für das Roti-Quick-Kit als auch für das RNeasy Midi-Kit wurde in der UV-Spektrometrie eine ausreichende Reinheit der isolierten RNA mit einer $A_{260/280}$ -Ratio zwischen 1,5 und 2,0 erreicht. Die Qualitätskontrolle der RNA mittels der Gelelektrophorese ergab jedoch für beide Kits sowohl für das DNA- als auch für RNA-Gel keine ausreichenden bzw. gar keine Banden für die CK20- und die GAPDH-Sequenz. Da sich selbst für die ubiquitär verbreitete GAPDH-Basenabfolge keine ausreichend reproduzierbaren Banden erreichen ließen und sich auch auf dem RNA-Gel bis auf wenige Ausnahmen keine Banden zeigten, musste auf eine mangelnde Qualität und Reinheit der isolierten RNA geschlossen werden. Die beiden Kits waren somit für unsere Zwecke nicht geeignet. Daraufhin nahmen wir eine Testung des RNazol-Kits

vor. Mit dieser Methode gelang es, sowohl in der UV-Spektrometrie eine ausreichende Reinheit mit einer $A_{260/280}$ -Ratio zwischen 1,5 und 2,0 zu erzielen, als auch in der RNA-Gel-Elektrophorese reproduzierbar positive Banden für die CK20- bzw. GAPDH-cDNA-Zielsequenz zu erreichen.

Für die CK20-Amplifikation wurden die Original-Primer-Sequenzen aus dem Protokoll von Soeth et al. (Soeth et al. 1996) verwendet, für die GAPDH-Amplifikation wurde eine etwas abgewandelte Basenabfolge (siehe Kapitel 3.1.1.) benutzt. Die von der Arbeitsgruppe um Soeth verwendeten RT-PCR-Zyklen wurden zur Ergebnisoptimierung modifiziert. Soeth verwendete für beide CK20-PCR-Zyklen (ersten Zyklus und nested-PCR-Zyklus) ein 9 Schritte umfassendes Touch-down-Protokoll gefolgt von 21 Thermozyklen (siehe Tabelle 13). Die Amplifikation der GAPDH-Sequenz erfolgte parallel zur CK20-Sequenz im ersten PCR-Zyklus.

Zunächst wurde eine Optimierung der Annealing-Temperatur angestrebt, dazu berechneten wir die Schmelztemperatur (T_m) der Primer.

Danach ergaben sich näherungsweise für die verwendeten Primer folgende Schmelztemperaturen:

CK20-OS: 68 °C	GAPDH 1: 68 °C
CK20-OA: 72 °C	GAPDH 2: 66 °C
CK20-IS: 60 °C	
CK20-IA: 68 °C	

Die Annealingtemperatur sollte die Schmelztemperatur der eingesetzten Primer nicht überschreiten, sondern um ca. 3°C unterhalb der Schmelztemperaturen liegen. Aus den oben errechneten Schmelztemperaturen der Primer wurde ersichtlich, dass die Annealingtemperatur, mit welcher der Touch-down des Original-Protokolls begann, relativ hoch gewählt war, so dass die PCR-Zyklen zunächst wie folgt geändert wurden:

Der erste PCR-Zyklus wurde zunächst weiter nach dem Touch-down-Protokoll von Soeth et al. (Soeth et al. 1996) durchgeführt, allerdings begann der Touch-down nicht mehr mit einer Annealing-Temperatur von 70 °C, sondern von 68 °C und er umfasste nur noch 7 Schritte. Die Annealingtemperatur der sich anschließenden Zyklen wurde um 1 °C auf 62 °C erhöht, die Anzahl der Zyklen wurde auf 23 angepasst. Die PCR-Banden blieben jedoch weiterhin sowohl für die CK20- als auch für die GAPDH-Sequenz ungenügend, d.h. die Banden stellten sich entweder sehr blass oder inkonstant dar.

Daraufhin wurde das Touch-down-Protokoll verlassen. Das im Folgenden entwickelte Protokoll für den ersten PCR-Zyklus umfasste 30 Zyklen mit insgesamt kürzeren Denaturierungs-, Annealing- und Extensionszeiten. Das exakte Optimum der Annealingtemperatur von 62 °C wurde dann empirisch durch Austestung im Thermocycler ermittelt. Das endgültige PCR-Protokoll ist ausführlich in Kapitel 4.1.2, Abbildung 3 beschrieben.

Der zweite PCR-Zyklus wurde nach den gleichen Kriterien optimiert, wie für den ersten beschrieben. Auch hier wurde kein Touch-down mehr verwendet, die Annealingtemperatur mit 57 °C niedriger gewählt und die Zeiten der einzelnen PCR-Schritte verkürzt. Das genaue Protokoll ist in Kapitel 4.1.2, Abbildung 4 dargestellt.

Die initiale Denaturierung darf nicht zu kurz gehalten sein, da sonst keine vollständige Denaturierung des Templates erfolgt und die Gefahr von misprimings und snapbacks des template-Doppelstranges besteht. Wir verwendeten daher im ersten PCR-Zyklus eine initiale Denaturierungszeit von 4 min, im nested PCR-Zyklus von 2 min. Die Extensionstemperatur wurde nicht verändert, da das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase bei 72 °C liegt. Die finale Extension ist wichtig für die Auspolymerisation und Renaturierung der Einzelstränge zum Doppelstrang, sie sollte eine Zeitspanne von 5 bis 15 Minuten umfassen. In einer optimalen PCR können weniger als 10 template-Sequenzen in weniger als 40 Zyklen so amplifiziert werden, dass sie hinterher in der Ethidiumbromid-Elektrophorese sichtbar sind. Im Allgemeinen sollte eine Zahl von 25-35 Zyklen verwendet werden, da bei zunehmender Anzahl von Zyklen unspezifische PCR-Produkte, wie z.B. Pseudogene, akkumulieren können. Um diese identifizieren und vom spezifischen CK20-Genprodukt unterscheiden zu können, wurde bei jeder Gel-Elektrophorese ein DNA-Größenmarker mit aufgetragen. Bei der hier verwendeten CK20-PCR-Methode konnte jedoch kein Auftreten von Pseudogenen beobachtet werden.

Mit diesen veränderten Thermozyklen in Verbindung mit der RNA-Extraktion mittels RNAzol-Kit waren sowohl für die CK20- als auch für die GAPDH-Sequenz deutlich sichtbare und reproduzierbare cDNA-Banden auf dem Elektrophorese-Gel darstellbar. Somit konnte durch Optimierung der RNA-Extraktion sowie der Thermozyklen für die RT-PCR eine PCR-Methode für die Zytokeratin 20-cDNA etabliert werden, die reproduzierbar, zuverlässig und ohne Interferenz mit Pseudogenen einen CK20-Nachweis führen kann.

Die Sensitivität der neu etablierten CK20-RT-PCR-Methode wurde an den Dilutionsstufen von 10^{-2} bis 10^{-7} von 3 verschiedenen Karzinomzelllinien in gesundem Knochenmark ermittelt. Dabei wurden mit Verdünnungen der Kolonkarzinomzelllinie HT29 die höchsten Sensitivitäten von bis zu 10^7 erreicht. Diese wurde ebenfalls getestet, weil zuvor bereits andere Arbeitsgruppen mit ihrer PCR-Methode an der Kolonkarzinomzelllinie zuverlässig einen positiven CK20-Nachweis erbringen konnten (Burchill et al. 1995, Soeth et al. 1996). Soeth und Mitarbeiter erreichten dabei hohe Sensitivitäten, sie konnten die CK20-mRNA noch in einer Menge von 0,5 pg nachweisen. Diese Ergebnisse lassen sich mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit nur begrenzt vergleichen, da hier die Verdünnungsreihen aus Dilutionen der kompletten Tumorzellen erstellt wurden und erst danach eine Extraktion der RNA durchgeführt wurde, während Soeth und Mitarbeiter Verdünnungen der bereits extrahierten Tumorzell-RNA vorgenommen haben (Soeth et al. 1996). Für die beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-453 war die Sensitivität deutlich geringer, ein Tumorzellnachweis war bis zu einer maximalen Verdünnung von $1 \cdot 10^{-5}$ bzw. $1 \cdot 10^{-4}$ möglich.

Die maximale Sensitivität von bis zu 10^7 der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten CK20-RT-PCR zeigt eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Sensitivitätsraten der PCR-Methode (Zippelius et al. 1997, Jung et al. 1998).

Es ist jedoch unklar, inwieweit diese an Karzinomzelllinien kalibrierte maximale Sensitivität der CK20-RT-PCR-Methode auch für den Tumorzellnachweis *in vivo*, d.h. in Stammzell- oder Knochenmarkproben von Patienten, zutrifft. Es wird jedoch vermutet, dass die Sensitivitäten, die von unterschiedlichen Nachweisverfahren *in vitro* an Karzinomzelllinien erhoben wurden, die absolute Sensitivität der PCR-Methode für den Nachweis von Tumorzellen in Patientenproben überschätzen. Man muss davon ausgehen, dass Zellkulturtechniken die Sensitivität für den Nachweis disseminierter Malignomzellen in humanen Stammzellprodukten um etwa das 100fache erhöhen (Joshi et al. 1990).

Die erhöhte Sensitivität der RT-PCR-Methode bei Verwendung von Mammakarzinom-Zelllinien aus Zellkulturverfahren, die mit Knochenmark kokultiviert wurden, lässt sich vermutlich zum einen durch einen erhöhten Verlust der reifen und ausdifferenzierten hämatopoetischen Zellen während des Kultivierungsprozesses erklären, mit einer daraus resultierenden erhöhten Dichte an Tumorzellen. Zum anderen entstammen die verwendeten Tumorzellen etablierten Zelllinien und sind damit zellkulturadaptiert, so

dass auch dadurch eine Überschätzung der Sensitivität möglich ist (Joshi et al. 1990). Es ist daher nicht gesichert, ob die Sensitivität von maximal 10^7 , die wir bei der Kalibration an der Kolonkarzinomzelllinie HT29 erreichen konnten, tatsächlich auch für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen in vivo gilt, oder ob die Nachweisgrenze hier nicht deutlich geringer liegt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 88 Proben von Hochrisiko-Patientinnen mit Mammakarzinom, bestehend aus Knochenmarkaspiraten, Leukapheresen und peripherem Blut, mit Hilfe der CK20-RT-PCR untersucht. Die CK20-cDNA-Sequenz konnte aus insgesamt 8 der 88 Proben (9%) amplifiziert werden.

Das Auftreten solcher disseminierten Malignomzellen in Knochenmark und mobilisierten Stammzellprodukten ist von vielen Autoren als unabhängiger Prognosefaktor für die rezidivfreie Überlebenszeit und das Gesamtüberleben von Patientinnen mit Mammakarzinom beschrieben worden. Ebenso hat sich eine positive Korrelation zwischen der Häufigkeit einer Tumorzellkontamination in Blutstammzellprodukten und dem Stadium der Erkrankung gezeigt (Fields et al. 1996). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben diesen Befund bestätigt, die Auftretenswahrscheinlichkeit disseminierter Tumorzellen in Knochenmark und Leukapheresen nahm mit fortschreitendem Tumorstadium zu. Patientinnen im Tumorstadium IV wiesen in 20% der Fälle (4/20) eine Mikrometastasierung auf, gegenüber lediglich 6% der Patientinnen (4/68) in den Tumorstadien II und III. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lagen damit im Tumorstadium IV sowohl für die Leukapheresen mit 18% als auch für die Knochenmarkproben mit 40% deutlich unter dem in der Literatur beschriebenen maximalen Ausmaß der Tumorzellkontamination von bis zu 100% der Leukaphereseprodukte (Hempel et al. 1996) sowie bis zu 87% der Knochenmarkproben (Krüger et al. 1999 a). Die Tumorzellkontamination in den Mammakarzinom-Stadien II-III lag mit 8% der Leukapheresen und 9% der Knochenmarkproben im unteren Bereich der von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Kontaminationsraten von 4-55% der Leukapheresen (Vredenburg et al. 1997, Krüger et al. 1999 b) bzw. 11-60% der Knochenmarkproben (Passos-Coelho et al. 1996, Moscinski et al. 1996). Allerdings haben auch die verschiedenen zu diesem Thema veröffentlichten Studienergebnisse deutlich differierende Kontaminationsraten gezeigt (siehe Tabelle 1).

Auch im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Daten von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren, die in der CK20-RT-PCR Kontaminationsraten von 17-

31% aufwiesen (Soeth et al. 1997), war das Ausmaß der nachgewiesenen Tumorzellkontamination bei den untersuchten Mammakarzinompatientinnen mit 9% der Proben gering. Diese deutlich differierenden Kontaminationsraten der CK20-RT-PCR bei unterschiedlichen Primärtumoren zeigten allerdings eine gute Übereinstimmung mit den von Wang et al. erhobenen Befunden. Die Arbeitsgruppe untersuchte mit Hilfe der Immunzytologie Gewebeproben verschiedener Primärtumoren hinsichtlich der Expression unterschiedlicher Zytokeratine und fand eine CK20-Expression für 9-18% der Mammakarzinompatienten-Proben, dagegen für 72-85% der gastrointestinalen Tumoren (Wang et al. 1995).

Diese Ergebnisse lassen auf eine zu geringe Transkription der CK20-mRNA in Mammakarzinomzellen schließen. Somit kann die CK20-RT-PCR, die in sie gesetzte Hoffnung auf eine hohe Sensitivität in Bezug auf den Nachweis disseminierter Mammakarzinomzellen nicht ausreichend erfüllen, ihre Eignung als Routinemethode für die MRD-Diagnostik beim Mammakarzinom ist daher fraglich.

Beim Vergleich von Immunzytologie und Polymerasekettenreaktion als Nachweisverfahren residueller Mammakarzinomzellen deutete sich prinzipiell eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden an. Es zeigte sich in 78,8% der 66 untersuchten Proben von Patientinnen mit Mammakarzinom ein übereinstimmendes Ergebnis. Allerdings fiel auch hier auf, dass mit Hilfe der CK20-RT-PCR eine geringere Anzahl disseminierter Tumorzellen (12,1%) nachgewiesen werden konnte als mittels der Immunzytochemie mit CK19-Antikörpern (15,1%). Dieser Unterschied wird noch relevanter, wenn man bedenkt, dass die PCR sowohl in dieser Arbeit als auch in der Literatur (Jung et al 1998, Fields et al. 1996, Traweek et al. 1993) eine Sensitivität von bis zu $1 \cdot 10^7$ erreicht, die Immunzytologie dagegen nur Sensitivitäten bis maximal $2 \cdot 10^6$ (Naume et al. 1997). Der Sensitivitätsunterschied zwischen Immunzytologie und PCR wird bei Tumorzellverdünnungen von 10^{-6} bis 10^{-7} relevant. In diesem Verdünnungsbereich liefert die Polymerasekettenreaktion, wie auch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte CK20-RT-PCR, noch zuverlässig einen Tumorzellnachweis, während er außerhalb der Nachweisgrenze der Immunzytologie liegt.

Betrachtet man neben der Sensitivität und der weiter unten beschriebenen Spezifität der CK20-RT-PCR-Methode die Kontaminationsrate des Knochenmarks mit disseminierten Tumorzellen im Vergleich zu den Blutstammzellprodukten, so findet sich die Annahme einer höheren Kontamination im Knochenmark (Ross et al. 1993) in den Ergebnissen

dieser Arbeit nicht bestätigt. Es zeigte sich mit 14% tumorzellpositiven Knochenmark- und 11% positiven Blutstammzellproben ein nahezu identisches Ausmaß der Tumorzellkontamination. Dieser Befund bestätigte die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (siehe Tabelle 1), die ähnliche oder sogar höhere Kontaminationsraten der Leukaphereseprodukte (Brugger et al. 1994) im Vergleich zu den Knochenmarkproben fanden. Es wird zurzeit auch diskutiert, ob durch die Anwendung von Wachstumsfaktoren zur Stammzellgewinnung gleichzeitig eine Tumorzell-Komobilisierung ausgelöst wird (Kvalheim et al. 1996b). Die zunehmende Frequenz, mit der mikrometastatische Zellen auch in mobilisierten Blutstammzellprodukten nachgewiesen werden, scheint auch auf die verbesserte Sensitivität der Nachweisverfahren zurückzuführen zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls das Ausmaß einer Tumorzellkontamination im peripheren Blut (PB) von Mammakarzinompatientinnen untersucht. In den untersuchten peripheren Blutproben ließen sich jedoch keine Tumorzellen nachweisen. Somit ist festzuhalten, dass in den getesteten Proben von Mammakarzinompatientinnen häufiger positive PCR-Befunde für CK20 in Knochenmark und Leukapheresen auftreten als im peripheren Blut, so dass man von einer höheren Tumorzellkontamination in diesen beiden hämatologischen Kompartimenten ausgehen kann.

Ein weiterer limitierender Faktor für den Einsatz der RT-PCR in der klinischen Routinediagnostik ist die von vielen Forschergruppen beschriebene mangelnde Spezifität im Nachweis von Mikrometastasen. Hinsichtlich der Spezifität der Polymerasekettenreaktion kamen die mit dieser Methode befassten Arbeitsgruppen zu kontroversen Ergebnissen. In einigen der verwendeten PCR-Essays fanden sich in bis 75% falsch-positive Ergebnisse (Krismann et al. 1995, Jung et al. 1997 und 1999, Zippelius et al. 1997), andere Arbeitsgruppen dagegen erreichten hohe Spezifitäten mit ausschließlich negativen PCR-Befunden in der Kontrollgruppe ohne Karzinom (Zach et al. 1999, Burchill et al. 1995). Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte RT-PCR-Methode verwendet die Zytokeratin 20-cDNA als Zielsequenz. Zielsetzung war dabei, ein sensitives und hochspezifisches Verfahren zur Detektion mikrometastatischer Mammakarzinomzellen zu entwickeln, nachdem sich bei einer Vielzahl der zuvor getesteten mRNA-Zielsequenzen im Verlauf bedauerlicherweise eine mangelnde Spezifität in Hinblick auf die selektive Detektion epithelialer Tumorzellen herausgestellt hatte. Beim Zytokeratin 20 handelt es sich um einen Bestandteil des Zytoskelettes, der

sich bislang als hochspezifischer Marker für epitheliale Tumoren des Gastrointestinaltraktes dargestellt und keine aberrante Expression in hämatopoetischen Geweben gezeigt hatte (Soeth et al. 1997, Wang et al. 1995, Moll et al. 1990, 1992, 1993, Burchill et al. 1994). Immunologische Studien konnten eine CK20-Expression auch in anderen epithelialen Geweben wie Lunge, Brust und Endometrium nachweisen (Wang et al. 1995). Auf der Grundlage dieser Daten, die eine hohe Spezifität der CK20-RT-PCR-Methode für die Detektion disseminierter Tumorzellen gastrointestinalen Ursprungs andeuteten und somit bereits erste Hoffnungen weckten, dass ein hochspezifischer Marker für epitheliale Gewebe gefunden worden sei, ist in der vorliegenden Arbeit eine Evaluation der Spezifität dieser PCR-Methode nun auch für das Mammakarzinom vorgenommen worden. Diese hohe Spezifität der CK20-Expression für epitheliale Gewebe ließ sich hier jedoch nicht bestätigen.

In der Kontrollgruppe, die aus 56 Personen ohne epitheliale Tumorerkrankung bestand und sich im Einzelnen aus 14 gesunden Spendern, 36 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, 3 Patienten mit Lymphom und 3 Patienten mit Sarkom zusammensetzte, fand sich eine hohe Anzahl falsch-positiver CK20-RT-PCR-Ergebnisse. Die Anzahl der CK20-positiven PCR-Banden im Kontrollkollektiv überschritt mit 14% (8/56) sogar noch die der Mammakarzinompatienten-Proben (9%). Somit muss man sich auch beim Zytokeratin 20, wie bereits bei anderen zunächst sehr viel versprechenden Markermolekülen, von der Hoffnung verabschieden, mit diesem Zytokeratin eine Zielsequenz gefunden zu haben, die hochspezifisch ausschließlich von epithelialen Zellen exprimiert wird. Die hohe Anzahl falsch-positiver PCR-Ergebnisse dieser Arbeit steht im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Forschergruppen. Die Arbeitsgruppe um Soeth, die in ihrer Studie identische Primer und ein ähnliches methodisches Versuchsdesign verwendete, fand in den 70 Knochenmark- und Blutproben ihrer Kontrollgruppe in nur 4 Proben einen positiven Befund, es handelte sich bei diesen um einen Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis, einen mit chronischer Pankreatitis und um das Knochenmark und die Blutprobe eines Patienten mit hepatozellulärem Adenom. Alle anderen Proben wiesen einen negativen Befund auf (Soeth et al. 1997). Auch in einer Studie von Burchill und Mitarbeitern (Burchill et al. 1995) ließ sich mit Hilfe der CK20-RT-PCR in den 21 Knochenmark- und peripheren Blutproben der Kontrollgruppe keine CK20-Expression nachweisen.

Große Unterschiede hinsichtlich der erreichbaren Spezifität der RT-PCR waren bereits zuvor für andere mRNA-Zielsequenzen, wie z.B. die des Zytokeratins 19, gefunden worden. Vergleicht man die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, die mit dieser Thematik befasst waren (Krismann et al 1995, Jung et al. 1998, Datta et al. 1994, Krüger et al. 1994, Fields et al. 1994 und 1996), so findet man trotz zum Teil sehr ähnlicher Versuchsdesigns eine stark differierende Anzahl falsch-positiver Ergebnisse der CK19-RT-PCR in den Kontrollgruppen, die zwischen 0-38% liegt.

Die Gründe für die sehr unterschiedliche Spezifität der PCR beim Nachweis disseminierter Tumorzellen werden seit Jahren diskutiert, als Ursachen kommen sowohl methodisch-analytische als auch biologische Faktoren in Betracht.

Ursachen, die im analytischen Bereich zu differierenden Ergebnissen geführt haben könnten, sind zum einen unterschiedlich strukturierte Studien-Designs in den verschiedenen Arbeitsgruppen, zum anderen unterschiedliche Kriterien bei der Auswahl des Patienten- und Kontrollkollektivs. Jung et al. (Jung et al. 1998) befassten sich intensiv mit der Rolle, die die Auswahl der Kontrollgruppe auf die Resultate der RT-PCR haben könnte. Sie teilten das inhomogene Kontrollkollektiv in kleinere und homogenere Untergruppen auf und untersuchten diese separat auf falsch-positive PCR-Ergebnisse. Bei dieser Studie wurde das Zytokeratin 19 (CK19) sowie das Carcinoembryonale Antigen (CEA) als Zielsequenz zur Untersuchung der verschiedenen Subgruppen verwendet. Die Arbeitsgruppe erhielt für die Untergruppen der gesunden Personen und der Patienten mit hämatologischen Erkrankungen ausschließlich negative, für die Gruppe der Patienten mit entzündlichen Erkrankungen dagegen bis zu 60% spezifische, aber offensichtlich falsch-positive PCR-Befunde.

Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass durch eine Inflammationsreaktion des Körpers eine Induktion hämatopoetischer Zellen zur Expression dieser normalerweise epithelspezifischen Markermoleküle erfolgen könnte. Um den Einfluss der chronischen Entzündungsreaktion als möglichen biologischen Faktor auf die mRNA-Transkription genauer zu untersuchen, führten Jung und Mitarbeiter (Jung et al. 1998) in vivo und in vitro Untersuchungen mit Zytokinen durch. Zum einen untersuchten sie mit G-CSF mobilisierte Stammzellen von Patienten ohne epitheliales Karzinom und fanden positive PCR-Ergebnisse für das CEA, dagegen negative für CK19. Zusätzlich wurden die Knochenmark-, Leukapherese- und peripheren Blutproben einer Kontrollgruppe ohne epitheliales Karzinom mit und ohne Zytokinstimulation für 7 Tage in Zellkultur genommen. Es zeigte sich eine Hochregulation der CEA-Expression

im Knochenmark und in peripheren Blutzellen unter der Stimulation mit Interferon- γ . Die Stimulation mit anderen Zytokinen rief dagegen keine nachweisbare Transkription der CEA-mRNA hervor. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass eine Entzündungsreaktion tatsächlich die CEA-mRNA-Expression in hämatopoetischen Zellen induzieren könnte. Die CK19-mRNA konnte aus den Knochenmarkproben nach einer 7tägigen Anzucht in Zellkultur sowohl mit als auch ohne zusätzliche Zytokin-Stimulation amplifiziert werden. In den Stammzellproben war dagegen nur nach Stimulation mit den Zytokinen SCF, IL3, IL6 und INF- γ ein positives PCR-Ergebnis verifizierbar. Es wäre daher möglich, dass die CK19-mRNA-Transkription durch Zytokine, die im Entzündungsprozess eine Rolle spielen, in Knochenmarkzellen, in Gegenwart von Stromazellen oder aber auch in den Stromazellen selbst induziert werden kann. Auch in den mobilisierten Blutstammzellen ist unter spezifischen Bedingungen eine CK19-Transkription auslösbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse von Jung et al. (Jung et al. 1998) wurden in der vorliegenden Arbeit keine Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen in die Kontrollgruppe aufgenommen. Das untersuchte Kontrollkollektiv bestand aus gesunden Spendern, Lymphom- und Sarkompatienten, sowie Patienten mit hämatologischen Erkrankungen. Trotz der verwendeten Ausschlusskriterien ergab sich die oben beschriebene relativ hohe Anzahl von spezifischen, jedoch falsch positiven CK20-RT-PCR-Ergebnissen. Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Resultat, der konform mit den Ergebnissen und Erkenntnissen von Jung und Mitarbeitern (Jung et al. 1998) geht, wäre die Tatsache, dass auch bei Lymphom- Sarkom- und hämatologischen Erkrankungen Zytokine eine zentrale Rolle spielen (Ruka et al. 2001, Samaniego et al. 1997, Jones et al. 2002, Kiersnowska-Rogowska et al. 1997) und eine CK20-Transkription induzieren.

Um die Möglichkeit einer Induzierbarkeit der CK20-Transkription in hämatopoetischen Zellen genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit in vivo und in vitro-Stimulationen mit verschiedenen Zytokinen durchgeführt. Die Mobilisation von Knochenmarkstammzellen in das periphere Blut mit Hilfe von G-CSF, die, wie zuvor beschrieben, bei den Kontrollpersonen durchgeführt wurde, entsprach im Prinzip einer in vivo-Stimulation von hämatopoetischen Zellen mit dem Zytokin G-CSF. Wie bereits erwähnt, führte sie allerdings nicht zu einer erhöhten Anzahl positiver PCR-Ergebnisse in den Leukaphereseproben im Vergleich zu den Knochenmarkaspiraten.

Für die in vitro-Experimente wurden zunächst Zelllinien myeloiden und lymphoiden

Ursprungs sowie Fibroblasten kultiviert und mit Hilfe der CK20-RT-PCR untersucht. Zusätzlich wurde eine Stimulation dieser Zelllinien mit unterschiedlichen Zytokinen durchgeführt und das Zellmaterial nach 7-tägiger Kultivierungszeit ebenfalls der RT-PCR zugeführt, um so die biologische Interferenz dieser Zytokine, die sowohl bei Entzündungsprozessen als auch bei Lymphom-, Sarkom- und hämatologischen Erkrankungen frei werden, auch für die CK20-mRNA-Transkription genauer zu erforschen.

Die myeloide Zelllinie K562, die von einer chronisch myeloiden Leukämie in der Blastenkrise abstammt, wies in 31% der untersuchten Proben einen CK20-positiven PCR-Befund auf. Die zusätzliche Stimulation mit den Zytokinen IL3, IL6, IL-1 β , TPO, flt3-Ligand, SCF, INF- γ , G-CSF und GM-CSF führte dabei nicht zu einer erhöhten Anzahl an positiven Ergebnissen. In allen anderen untersuchten Zelllinien konnte dagegen, von zwei Ausnahmen abgesehen, weder mit noch ohne Zytokin-Stimulation ein CK20-positives PCR-Ergebnis gefunden werden. Die beiden Ausnahmen bildeten die Zelllinien HL60 und Raji, die nach Stimulation mit dem flt3-Liganden in einer von drei bzw. einer von zwei untersuchten Proben einen positiven PCR-Befund zeigten.

Der CK20-positive Befund in der Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinie Raji ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht erklärbar. Für die CK20-Amplifikation aus den Kulturen der Zelllinien K562 (CML) und HL60 (Promyelozytische Leukämie) liefert eine von Jung et al. (Jung et al. 1999) veröffentlichte Studie einen möglichen Erklärungsansatz. Diese Studie, deren Ergebnisse im Einklang mit unseren Befunden stehen, beschreibt eine stabile „low-level-background-Transkription“ des CK20-Gens in der Granulozytenfraktion der Leukozyten als eine der Ursachen für die so genannte unspezifische CK20-Amplifikation durch die RT-PCR. Diese Ergebnisse zeigten damit erstmalig, dass auch die Expression des bisher für hoch-spezifisch gehaltenen Zytokeratins 20 nicht auf epitheliale Zellen beschränkt ist. Die CK20-Transkription aus den Kulturen der Zelllinien K562 und HL60 ließe sich daher über den myeloiden Ursprung dieser Zelllinien erklären. Es stellte sich somit die Frage, ob dieser Befund der „low-level-Transkription“ des CK20-Genes in der Granulozytenfraktion auch für andere spezifische, jedoch offensichtlich falsch-positive Ergebnisse der CK20-RT-PCR in normalerweise CK20-negativen Proben verantwortlich ist.

Die Arbeitsgruppe um Jung verwendete zur Gewinnung der mononukleären Zellfraktion der hämatologischen Proben sowohl die Erylyse als auch die Ficoll-Gradienten-Separation. In der mononukleären Zellfraktion der Kontrollgruppen, die mit Hilfe der

Erylyse gewonnen worden war, fand sich in 24% (gesunde Spender) bis 40% (Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen) der Fälle ein falsch-positiver PCR-Befund. Bei Verwendung der Ficoll-Gradienten-Separation zur Gewinnung der MNC konnte dagegen die hohe Spezifität der CK20-RT-PCR wieder hergestellt werden. Die CK20-exprimierenden Zellen in den Erylyse-Proben konnten von Jung et al. als Granulozyten identifiziert werden. Es ist bekannt, dass mittels der Erylyse ausschließlich die Erythrozyten von der mononukleären Zellfraktion abgetrennt werden, während bei der Ficoll-Gradienten-Separation zusätzlich zu den Erythrozyten zumindest Teile der Granulozyten entfernt werden. Dies könnte auch die Erklärung für die hohe Spezifität sein, die Soeth und Mitarbeiter (Soeth et al. 1997) bei der Untersuchung von Kontrollpersonen mit ihrer CK20-RT-PCR-Methode erreichten, denn sie verwendeten ausschließlich die Ficoll-Gradienten-Separation zur Isolierung der mononukleären Zellen. Damit wird deutlich, dass auch methodische Unterschiede im Versuchsdesign die Untersuchungsergebnisse stark beeinflussen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Gewinnung der mononukleären Zellen aus den Proben des Kontrollkollektivs und der Mammakarzinompatienten aufgrund der geringen Menge des Probenmaterials fast ausschließlich die Erylyse verwendet. Es stand nur in insgesamt drei Fällen genügend Material für die Durchführung einer Ficoll-Gradienten-Separation zur Verfügung (siehe Tabelle 19), so dass sich keine sichere Aussage darüber machen lässt, ob der hohe Anteil falsch-positiver PCR-Ergebnisse in der Kontrollgruppe sich auf die beschriebene low-level-Expression des CK20-Genes in der durch die Erylyse nicht entfernten Granulozytenfraktion zurückführen lässt. Es ist jedoch generell fraglich, inwieweit durch den Einsatz der Ficoll-Gradienten-Separation eine komplette Entfernung der Granulozyten stattfindet. Hierzu existieren bislang noch keine gesicherten Daten.

Auch andere Gesichtspunkte lassen daran zweifeln, dass die Ficoll-Gradienten-Separation der Erylyse in der Routinediagnostik von Mammakarzinompatienten-Proben mittels der CK20-RT-PCR überlegen ist, da es durch diese Methode vermutlich zu einem Verlust an Tumorzellen kommt. Diese Entdeckung wurde kürzlich von Krüger et al. (Krüger et al. 2000) publiziert. Die Gruppe konnte mit Hilfe der Immunzytologie einen signifikanten Tumorzellverlust nach Bearbeitung von Knochenmarkproben durch Ficoll-Gradienten-Separation im Vergleich zur Erylyse nachweisen. Für das PCR-Assay konnte in dieser Studien dagegen kein Einfluss der Separationsmethode auf die Detektionsrate disseminierter Tumorzellen festgestellt werden. Es werden noch weitere Studien erforderlich sein, um diese Beobachtung genauer zu erforschen und zu belegen. Die aberrante (low-level) Transkription epithelspezifischer oder tumor-assoziiertes Gene als möglicher Störfaktor der spezifischen Transkription findet sich nicht nur in der Granulozytenfraktion sondern auch in anderen hämatopoetischen Zellen. So konnten Traweek et al. (Traweek et al. 1993) eine Expression der Zytokeratine 8, 18 und 19 in Stromazellen und Zellen hämatopoetischen Ursprungs nachweisen. Krismann und Mitarbeiter (Krismann et al. 1995) fanden eine Expression von CK19-mRNA in peripheren Blutzellen.

Zusätzlich zu den Zelllinien wurden auch Knochenmark- und Leukaphereseproben von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und von gesunden Spendern mit und ohne Zusatz von Zytokinen für 7 Tage in Zellkultur genommen. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit denen der kultivierten Zelllinien. Die zusätzliche Stimulation mit Zytokinen führte zu keiner signifikanten Änderung gegenüber den unstimulierten Proben. Die Proben, die ohne Zusatz von Zytokinen kultiviert worden waren, zeigten in 10% einen positiven PCR-Befund, die Anzahl der positiven Ergebnisse unter den stimulierten Proben variierte zwischen 0-23%, ohne dass ein Muster erkennbar wurde. Es bestand weiterhin kein Unterschied in der Anzahl der positiven PCR-Befunde zwischen den Blutstammzell- und den Knochenmarkproben, wie sie von Jung und Mitarbeitern (Jung et al. 1998) für die CEA-Expression beschrieben wurde.

Einen weiteren biologischen Einflussfaktor auf die Zytokeratin-Expression könnten auch die Zellkulturbedingungen als solche darstellen. Wie schon zuvor erwähnt, existieren bereits Studienergebnisse (Joshi et al. 1990), die eine Sensitivitätserhöhung im Nachweis disseminierter Tumorzellen durch Zellkulturtechniken vermuten lassen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Kulturbedingungen nicht nur einen Einfluss auf die

Sensitivität, sondern auch auf die Spezifität der PCR-Methode haben. Vorstellbar wäre, dass die hämatopoetischen Zellen, ähnlich wie durch eine chronische Entzündungsreaktion, durch die Kulturbedingungen dazu veranlasst werden, bestimmte Stoffe freizusetzen, die wiederum eine aberrante Transkription epithel-spezifischer Gene induzieren. Von Joshi und Mitarbeitern wurde bereits 1990 diskutiert, ob die Bedingungen in der Zellkultur Knochenmarkszellen zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren anregen, die zu einer aberranten Zytokeratin-Expression durch hämatopoetische Zellen führt.

In dieser Arbeit wurden daher alle Zelllinien myeloiden und lymphoiden Ursprungs sowie Fibroblasten auch ohne Zusatz von Zytokinen unter den gleichen Kulturbedingungen für 7 Tage in Zellkultur genommen, um untersuchen zu können, ob allein die Bedingungen der Zellkultur für eine vermehrte CK20-mRNA-Transkription verantwortlich sind oder ob diese tatsächlich auf die Zytokin-Stimulation zurückzuführen ist. Mit Ausnahme von K562 führte die siebentägige Kultivierung bei keiner der untersuchten Zelllinien zu einer CK20-Expression. Es bleibt damit weitgehend unklar, welche komplexen Vorgänge und Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellpopulationen zu einer aberranten Expression von Zytokeratin 20 führen und somit die Spezifität der CK20-RT-PCR-Methode beeinflussen. Die Klärung dieser Frage, die schon andere Forschergruppen beschäftigt hat (Jung et al. 1997, Joshi et al. 1990), wird in Zukunft zusätzlicher Untersuchungen bedürfen.

Als weiterer biologischer Faktor, der die Spezifität der RT-PCR beeinflussen kann, wurde die unspezifische Amplifikation von Pseudogenen neben der spezifischen Amplifikation der mRNA-Zielsequenz beschrieben. Dieses Phänomen wurde bislang bei den Zytokeratin-Protokollen, insbesondere beim Zytokeratin 18, beobachtet (Zippelius et al. 1997 und Neumaier et al. 1995). Bei der Amplifikation der CK20-mRNA mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit entwickelten PCR-Assays trat bislang keine unspezifische Amplifikation von Pseudogenen auf. Auch in der Literatur findet sich bisher keine Beschreibung einer Spezifitätsbeeinträchtigung der CK20-RT-PCR durch Co-Amplifikation von Pseudogenen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hohe Anzahl der falsch positiven Ergebnisse der CK20-RT-PCR im Kontrollkollektiv mit einer Interferenz verschiedener Faktoren zu erklären ist, die zu einer aberranten Amplifikation der CK20-mRNA führen. Am plausibelsten erscheint zum einen die Möglichkeit, dass durch die hämatologische Erkrankung im Körper der untersuchten Patienten Mediatoren,

Interleukine und andere modulatorische Faktoren freigesetzt werden, die eine CK20-Expression in Zellen induzieren, die dieses Zytokeratin unter normalen Bedingungen nicht exprimieren. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die beschriebene stabile low-level-Expression von CK20 in der Granulozyten-Fraktion für den hohen Anteil CK20-positiver PCR-Banden in der Kontrollgruppe verantwortlich sein könnte.

Die Arbeitsgruppe um Traystman untersuchte nicht nur mögliche Ursachen für falsch positive Ergebnisse, die im Zusammenhang mit der PCR-Methode beschrieben wurden, sondern beschäftigte sich darüber hinaus auch mit der Möglichkeit einer Entstehung falsch-negativer PCR-Befunde (Traystman et al. 1997). Sie beschrieb die technischen Schwierigkeiten bei der Herstellung von hohen Tumorzellverdünnungsstufen wie einer Tumorzelle in 10^7 mononukleären Zellen. Da die Anzahl der Tumorzellen im Rahmen des Verdünnungsprozesses mit einer Poisson-Verteilung beschrieben werden kann, ist die Wahrscheinlichkeit einer falsch-negativen Probe bei hohen Verdünnungen umso größer, je kleiner die Gesamtzellmenge ist. Aus ethischen Gründen war in unseren Versuchen die verwendete Materialmenge der Patientenproben auf $2 \cdot 10^7$ mononukleäre Zellen begrenzt. Es wäre also zu erwarten, dass die Anzahl an positiven PCR-Ergebnissen bei höheren Zellzahlen in den eingesetzten Proben noch zunähme. Andererseits wird von Traystman et al. auch eine Zunahme der falsch-positiven PCR-Ergebnisse mit zunehmender Zellmenge diskutiert, so dass durch Erhöhung der eingesetzten Zellzahl allein keine Verbesserung der Spezifität der PCR-Methode zu erwarten ist. Die Zunahme der falsch-positiven PCR-Signale bei Erhöhung der verwendeten Zellzahl wird auf das vermehrte Auftreten illegitimer PCR-Transkripte epithelspezifischer Gene zurückgeführt, die unspezifisch durch hämatopoetisches Gewebe synthetisiert wurden. Die Autoren ziehen aus ihren Ergebnissen die Schlussfolgerung, dass die höchste Aussagekraft und damit höchste Spezifität der PCR-Methode in der Beurteilung der wahren Tumornegativität einer Probe liegt (d.h. dem prädiktiven Wert eines negativen PCR-Ergebnisses).

Die Entwicklung eines noch spezifischeren als derzeit verfügbaren und dabei hochsensiblen Verfahrens für den Nachweis disseminierter Tumorzellen in den verschiedenen Blutkompartimenten des Körpers ist von größter Wichtigkeit für die medizinische Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms. Hier wäre ein entscheidender Ansatz geschaffen für die frühzeitigere Erkennung einer Mikrometastasierung bzw. eines Rezidivs.

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, die denkbar wären, um eine solche Nachweismethode zu entwickeln. Zum einen könnte ein völlig neues Verfahren, unabhängig von Polymerasekettenreaktion und Immunzytologie entwickelt werden, welches dem Anspruch an eine hohe Spezifität im Nachweis disseminierter Tumorzellen gerecht wird. Zum anderen bestünde die Möglichkeit, die Spezifität der PCR-Methode zu verbessern, beispielsweise durch den gleichzeitigen Einsatz von zwei oder mehr spezifischen mRNA-Zielsequenzen für epitheliale Tumorzellen. Dieser Ansatz könnte realisiert werden, indem man dem PCR-Aliquot einer Patientenprobe die Primer 5 von zwei unterschiedlichen, jedoch für Mammakarzinomzellen spezifischen Zielsequenzen (z.B. Mammaglobin und CK20) zusetzt und in der Gel-Elektrophorese nur diejenigen Proben als positiv bewertet, die für beide DNA-Zielsequenzen eine spezifische Bande aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden 66 Proben von Mammakarzinompatientinnen mittels RT-PCR parallel auf die Zielsequenzen Zytokeratin 20 und Mammaglobin untersucht, allerdings in getrennten Reaktionsansätzen. In 66% der Fälle zeigten sich übereinstimmende Ergebnisse, so dass von einer Erhöhung der Spezifität ausgegangen werden kann, wenn ausschließlich die sich in beiden PCR-Assays deckenden Befunde als positiv bzw. negativ im Sinne einer Mikrometastasierung gewertet werden. Mit dieser Methode, ebenso wie mit der Untersuchung auf mehrere spezifische Zielsequenzen im gleichen PCR-Ansatz, kann keine 100%ige Sicherheit für den Nachweis von Mikrometastasen in den Patientenproben erzielt werden, wohl aber eine deutliche Erhöhung der Spezifität.

6. Zusammenfassung

Die Hochdosischemotherapie mit autologer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation wurde bereits erfolgreich zur Behandlung maligner Erkrankungen wie dem Hodgkin-Lymphom, dem therapierefraktären niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphom und der akuten myeloischen Leukämie eingesetzt und wird gegenwärtig für bestimmte Stadien des Mammakarzinoms in kontrollierten klinischen Studien geprüft (Zander et al. 1996 und 2004, Gianni et al. 1997, Shiba et al. 2000, Hurd et al. 1995). Einen Therapieerfolg verspricht man sich vor allem für Patientinnen im Tumorstadium II oder III mit mehr als 10 befallenden axillären Lymphknoten. In stadienabhängiger Ausprägung können im Knochenmark und in mobilisierten Stammzellen von Mammakarzinompatientinnen Mikrometastasen nachgewiesen werden, die für ein fortgeschrittenes Tumorstadium sprechen und einen unabhängigen Prognosefaktor darstellen.

Der Nachweis dieser Mikrometastasen ist daher von großer Bedeutung und klinischem Nutzen für Diagnosestellung, prognostische Beurteilung und Verlaufskontrolle von Karzinompatienten. Hier liegt das Betätigungsfeld der Polymerasekettenreaktion und Immunzytologie, wobei die Immunzytologie zurzeit noch die Standardmethode zum quantitativen Nachweis disseminierter Tumorzellen darstellt. Die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion als neueres und hochempfindliches eingeschätztes Verfahren wird seit einiger Zeit auch zum qualitativen Nachweis von Mikrometastasen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde eine RT-PCR mit Zytokeratin 20 als mRNA-Zielsequenz etabliert. Diese beiden Nachweismethoden wurden einander bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität gegenüber gestellt.

Hinsichtlich der Sensitivität im Nachweis disseminierter Tumorzellen fand sich eine deutliche Überlegenheit der CK20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion, die für die Kolonkarzinomzelllinie HT29 in guter Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur maximale Sensitivitäten von $1 \cdot 10^7$ erreichte. Für die Immunzytologie wird ein sicherer Nachweis bis zu Tumorzellverdünnungen von $2 \cdot 10^{-6}$ beschrieben. Für die untersuchten Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-453 fanden sich dagegen lediglich wesentlich geringere Sensitivitäten der CK20-RT-PCR bis maximal $1 \cdot 10^{-5}$ bzw. $1 \cdot 10^{-4}$.

Die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der CK20-RT-PCR ermittelte Tumorzellkontaminationsrate von Proben von Hochrisiko-Patientinnen mit Mammakarzinom

betrug insgesamt lediglich 9%. Damit lagen die Ergebnisse im Tumorstadium IV sowohl für die Leukapherese- als auch für die Knochenmarkproben mit 18% bzw. 40% deutlich unter dem in der Literatur beschriebenen maximalen Ausmaß der Tumorzellkontamination von bis zu 100% der Leukaphereseprodukte (Hempel et al. 1996) sowie bis zu 87% der Knochenmarkproben (Krüger et al. 1999 a). Für Mammakarzinom-Stadien II-III lagen die Tumorzellkontaminationsraten mit 8 bzw. 9% im unteren Bereich der von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Kontaminationsraten von 4-55% der Leukapheresen (Vredenburg et al. 1997, Krüger et al. 1999 b) bzw. 11-60% der Knochenmarkproben (Passos-Coelho et al. 1996, Moscinski et al. 1996).

Aufgrund dieser Ergebnisse muss von einer zu geringen Transkription der CK20-mRNA in Mammakarzinomzellen ausgegangen werden, die Eignung der CK20-RT-PCR als Routinemethode für die MRD-Diagnostik beim Mammakarzinom ist daher fraglich.

Die Spezifität der RT-PCR-Methode wird dagegen kontrovers diskutiert. Verschiedene Arbeitsgruppen kamen bei Verwendung dieser Nachweismethode zu stark differierenden Ergebnissen, selbst wenn sie die gleichen mRNA-Zielsequenzen verwendeten. Für die deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Spezifität bzw. den Mangel an Spezifität in den unterschiedlichen Studien werden methodische und biologische Einflussfaktoren verantwortlich gemacht. Zu den methodischen Einflussgrößen zählen mangelnde Standardisierung des Versuchsdesigns zwischen den unterschiedlichen, aber auch innerhalb der einzelnen Studien sowie verschiedene Kriterien bei der Auswahl des Patienten- und Kontrollkollektives. Als biologische Einflussfaktoren für die so genannte illegitime Gentranskription wurden bislang die Existenz von Pseudogenen (CK18), die Induktion einer Transkription unter bestimmten Bedingungen (CEA, CK19) und eine low-level-background-Transkription bestimmter Zellpopulationen beschrieben. Das Zytokeratin 20 war bisher in verschiedenen immunologischen und molekulargenetischen Studien als hochgradig epithelspezifisch beschrieben worden, so dass die Hoffnung bestand, nun endlich eine ideale und hochspezifische mRNA-Zielsequenz für den Nachweis epithelialer Tumoren gefunden zu haben. Leider konnten unsere Untersuchungen die hohe Spezifität der CK20-RT-PCR nicht bestätigen, es fand sich in der Kontrollgruppe, bestehend aus Personen ohne epitheliale Tumorerkrankung, ein Anteil von 14% falsch-positiver PCR-Ergebnisse. Um die Ursachen für diesen hohen Anteil an falsch-positiven Ergebnissen genauer zu ergründen, wurden verschiedene Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs sowie das

Knochenmark und Leukaphereseprodukte von Patienten ohne epitheliale Tumorerkrankung hinsichtlich der Transkription von Zytokeratin 20-mRNA sowohl vor als auch nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und siebentägiger Kultivierung in Zellkultur untersucht. Es zeigte sich, dass die Stimulation der Zelllinien und klinischen Proben mit Zytokinen keinen erkennbaren Einfluss auf die Zytokeratin 20-Transkription hatte. Einzig in der myeloiden Zelllinie K562, die einer chronisch myeloiden Leukämie in der Blastenkrise entstammt, fand sich mit 31% relativ konstant eine Zytokeratin 20-Amplifikation. Diese trat jedoch unabhängig von einer zuvor erfolgten Zytokin-Stimulation oder Zellkultivierung auf. Über die Ursache kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Möglicherweise findet sich auch in dieser myeloischen Zelllinie eine „low-level-background-Transkription“ des CK20-Gens, ähnlich wie sie bereits zuvor von Jung et al. 1999 für die Granulozytenfraktion der Leukozyten beschrieben wurde.

Die dargestellten Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die CK20-PCR-RT-Methode zwar, wie in früheren Studien von Soeth (Soeth et al. 1996) und Burchill (Burchill et al. 1995) gezeigt, für den Nachweis disseminierter Tumorzellen beim Colon-Karzinom gut geeignet, aufgrund einer augenscheinlich zu schwachen Transkription des CK20-Gens durch Mammakarzinomzellen jedoch für die MDR-Diagnostik bei Brustkrebspatientinnen nicht ideal ist.

Ein Einfluss von Zytokinen auf die Zytokeratin 20-Transkription als mögliche Ursache für die wechselnde Spezifität der CK20-RT-PCR konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

7. Literaturverzeichnis

- **Ali SM, Harvey HA, Lipton A** (2003) Metastatic breast cancer: overview of treatment. Clin Orthop Oct;(415Suppl): S312-7

- **Antman K, Ayash L, Elias LAD, Wheeler C, Tepler I, Hunt M, Frei E III** (1992) A phase II study of high-dose cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin with autologous marrow support in women with measurable advanced breast cancer responding to standard dose therapy. J Clin Oncol 10: 102

- **Antman KH, Rowlings PA, Vaughan WP et al.** (1997) High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support for breast cancer in North America. J Clin Oncol 15: 1870-1879

- **Ashworth TR** (1869) A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. Aust Med J 14: 146

- **Ayash IJ, Elias A, Wheeler C et al.** (1994) Double dose-intensive chemotherapy with autologous marrow and peripheral blood progenitor-cell support for metastatic breast cancer: a feasibility study. J Clin Oncol 12: 37-44

- **Babayan R, Schumpelick V** (1993) Brustdrüse. In: Schumpelick V, Bleese NM, Mommsen U (Hrsg), Enke Verlag, Stuttgart (Chirurgie, 3. Neubearb. und erw. Aufl., S. 385)

- **Bach FH, Amos DB** (1967). Hu-1: Major histocompatibility locus in man. Science 156: 1506-1508

- **Bader BL, Jahn L, Franke WW** (1988) Low level expression of cytokeratins 8, 18 und 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene. Eur J Cell Biol 47: 300-319

-
- **Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS** (1992) Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematotherapy* 1: 329-342

 - **Berger U, Mansi JL, Wilson P, Coombes RC** (1987) Detection of estrogen receptor in bone marrow from patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 5: 1779-1782

 - **Berger U, Bettelheim R, Mansi JL, Easton D, Coombes RC, Neville AM** (1988) The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis. *Am J Clin Pathol* 90: 1-6

 - **Berry DA, Broadwater G, Klein JP, Antman K et al.** (2002) High-dose versus standard chemotherapy in metastatic breast cancer: comparison of Cancer and Leukemia Group B trials with data from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry.

 - **Bonadonna G, Valagussa P** (1981) Dose response effect of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *N Engl J Med* 304: 10-15

 - **Bonadonna G, Zambetti M, Valagussa P** (1995) Sequential or alternating doxorubicin and CMF regimens in breast cancer with more than three positive nodes. Ten-year results. *J Am Med Ass* 273: 542-547

 - **Bonneterre J, Roché H, Bremond A et al.** (1998) Results of a randomized trial of adjuvant chemotherapy with FEC 50 versus FEC in 100 high risk node-positive breast cancer patients. *Proc ASCO* 17: 124a (abstr 473)

 - **Bortin MM, Bach FH, van Bekkum BW, Good RA, van Rood JJ** (1994) 25th anniversary of the first successful allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant*; 14: 211-212

 - **Brenner MK, Rill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Mirro J, Anderson WF, Ihle JN** (1993) Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone

marrow transplantation, *Lancet* 341: 1134-1137

- **Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L** (1994) Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* Feb 1; 83(3): 636-640

- **Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P** (1995) Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-chain reaction, *British Journal of Cancer* 71: 278-281

- **Buzzoni R, Bonadonna G, Valagussa P et al.** (1991) Adjuvant chemotherapy with doxorubicin plus cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil in the treatment of resectable breast cancer with more than three positive nodes. *J Clin Oncol* 9: 2134

- **Carella AM, Cavaliere M, Lerma E, et al.** (1999). Autologous peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukaemia. *Baolloeres Best Pract Res Clon Haematol* Mar; 12(1): 209-217

- **Champlin RE** (1995). Separation of graft-vs-host disease and graft-vs-leukemia against chronic myelogenous leukemia. *Exp. Haematol.* 23: 1148

- **Chevillard S, Muller A, Levalois C, Laine-Bidron C, Viehl P, Magdelenat H** (1996) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 41: 81-89

- **Chomczynski und Sacchi** (1987) Single-step method of RNA-isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159

- **Cooper D, Schermer A, Sun TT** (1985) Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest (United States)*, Mar, 52(3): 243-256

-
- **Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP** (1991) Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow mikrometastases, *J Clin Oncol* 9(10): 1749-1756

 - **Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS** (1994) Sensitive detection of occult breast cancer by the Reverse-Transcriptase Chain Reaction, *J Clin Oncol* 12(3): 475-482

 - **Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D, Hanania EG, Fu S, Ellerson D, Goldberg L, Thomas M, Janicek K; Anderson WF** (1994) Genetic marking shows that Ph⁺ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow transplantation for CML, *Blood* 83: 3068-3076

 - **De Vita VT** (1993) Principles of chemotherapy. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Cancer: principles and practice of oncology*. Lippincott, Philadelphia, pp 276-292

 - **Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Kaul S, Krempien B, Goerner R, Bastert G** (1990) Prognostische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom. [The prognostic significance of tumor cell detection in bone marrow of patients with breast cancer.] *Geburtshilfe Frauenheilkd* (Germany), Dec; 50(12): 923-928

 - **Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G** (1992) Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis, *J Clin Oncol* 10(10): 1534-1539

 - **Dreger P, Schmitz N** (2000) Stem Cell Transplantation for Chronic Lymphocytic Leukaemia. An Updated Review. High-dose Therapy and Transplantation of Haematopoietic Stem Cells. Blackwell Wissenschaft; pp 3-8

 - **Droz JP, Pico JL and Kramer A** (1993). Role of autologous bone marrow transplantation in germ-cell cancer. *Urol Clin North Am* 20: 161-171, 1993.

- **Dunphy FR, Spitzer G, Buzdar AU** (1990) Treatment of estrogen receptor negative hormonally refractory breast cancer with double high-dose chemotherapy intensification and bone marrow support. *J Clin Oncol* 8: 1207

- **Eaton MC, Hardingham JE, Kotasek D, Dobrovic A** (1997) Immunobead RT-PCR: a sensitive method for detection of circulating tumor cells, *Biotechniques* 22: 100-105

- **Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group** (1992) Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomized trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 339:1-15; 71-85

- **Eddy DM** (1992) High-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation for the treatment of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 10: 657-670

- **Elias AD, Ayash L, Andersen KC, Hunt M, Wheeler C, Schwartz G, Tepler I, Mazanet R, Lynch C, Pap S, Pelaez J, Reich E, Critchlow J, Demetri G, Bibbo J, Schnipper L, Griffin JD, III EF, Antman KH** (1992) Mobilisation of peripheral blood progenitor cells by chemotherapy and Granulocyt-Macrophage-Colony-Stimulating Factor for hematologic support after high dose intensification for breast cancer. *Blood* 79: 3036-3044

- **Fernand JP, Ravaud P, Chevret S, et al.** (1998) High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood* 1998, Nov 1; 92(9): 3131-3139

- **Fields KK, Moscinski LC, Trudeau WL, et al.** (1994) The use of polymerase chain reaction for amplification of cytokeratin 19 to detect bone marrow micrometastasis in breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 13: 115, (abstr 262)

-
- **Fields KK, Effenbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Janssen WE, Moscinski LC** (1996) Clinical significance of bone marrow metastasis as detected using the Polymerase Chain Reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation, *J Clin Oncol* 14: 1868-1876

 - **Franklin WA, Shpall EJ, Archer P, Johnston CS, Garza-Wiliams S, Hami L, Bitter MA, Bast RC, Jones RB** (1996) Immunohistochemical detection of breast cancer cells in marrow and peripheral blood of patients undergoing high dose chemotherapy with autologous stem cell support. *Breast Cancer Res Treat* 41 (1): 1-13

 - **Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M** (1994) Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction, *J Clin Oncol* 12: 725-729

 - **Gianni AM, Siena S, Bregni M, Di Nicola M, Orefice S, Cusumano F, Salvadori B, Luini A, Greco M, Zucali R, Rilke F, Zambetti M, Valagussa P, Bonadonna G** (1997) Efficacy, toxicity, and applicability of high-dose sequential chemotherapy as adjuvant treatment in operable breast cancer with 10 or more involved axillary nodes: five-year results. *J Clin Oncol* 15: 2312-2321

 - **Giralt S, Estey E, Albitar M, Van Besien K, Rodon G, Anderlini P, O'Brien S, Khouri I et al.** (1997 a) Engraftment of allogeneic haematopoietic progenitor cells with purin analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 89: 4531-4536

 - **Giralt S, Gajewski J, Khouri I, Körbling M, Claxton D, Mehra R, Przepioraka D, Andersson B, Talpaz M, Kantarjian H, Champlin R** (1997 b) Induction of graft-vs-leukemia (GvL) as primary treatment of chronic myelogenous leukemia (CML). *Blood* 90, Suppl.1: 418a

 - **Goldschmidt H, Martin H, Serke S, et al.** (2000) Tandem Autologous Transplantation for Multiple Myeloma: First Results of a German Multicentre Study.

High-dose Therapy and Transplantation of Haematopoietic Stem Cells. Blackwell Wissenschaft; pp 15-20

- **Gorin NC, Lopez M, Laporte JP, Quittet P, Lesage S, Lemoine F, Berenson RJ, Isnard F, Grande M, Stchowiak J** (1995) Preparation and successful engraftment of purged CD34+ bone marrow progenitor cells in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 85:1647-1654

- **Gradishar WJ, Tallman MS, Abrams JS** (1996) High-dose chemotherapy for breast-cancer. *Ann Intern Med* 125: 599-604

- **Gratwohl A** (1996) Entwicklung der hämatopoetischen Vorläuferzell-Transplantation. Knochenmark- und periphere Stammzelltransplantation. Basel, Karger, pp 1-7

- **Greenberg P, Bax I, Mara B, Schrier S** (1974) Alterations of granulopoiesis following chemotherapy. *Blood* 44: 375-383

- **Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W** (1994) Tumor cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up, *Br J Cancer* 69: 566-571

- **Hempel D et al.** (1996) Immunomagnetic cell selection for removal and enhanced detection of MRD from PBSZ harvests in breast cancer, *Blood* 88 (suppl 1): 251a

- **Hryniuk W and Levine MN** (1986) Analysis for dose intensity for adjuvant chemotherapy trials in stage II breast cancer. *J Clin Oncol* 4: 1162-1170

- **Hurd DD, Peters WP** (1995) Randomized, comparative study of high-dose (with autologous bone marrow support) versus low-dose cyclophosphamide, cisplatin, and carmustine as consolidation to adjuvant cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with operable stage II or III breast cancer involving 10 or more lymph nodes (CALGB Protocol 9082). *Cancer and Leukemia Group B. J Natl Cancer Inst Mono* (19): 41-44

-
- **Israeli RS, Miller WHJ, Su SL, Samadi DS, Powell CT, Heston WD, Wise GJ, Fair WR** (1995) Sensitive detection of prostatic hematogenous tumor cell dissemination using prostate specific antigen and prostate specific membrane-derived primers in the polymerase chain reaction, *J Urol* 153: 573-577

 - **Jones EA; Pringle JH; Angel CA; Rees RC** (2002) Th1/Th2 cytokine expression and its relationship with tumor growth in B cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Leuk Lymphoma Jun*;43(6):1313-21

 - **Jones RB, Shpall EJ, Ross M et al.** (1990) AFM induction therapy, followed by intensive alkylation agent consolidation with autologous bone marrow support (ABMS) for advanced breast cancer. Current results. *Proc Am Soc Clin Oncol* 9: 9

 - **Joshi SS, Novak DJ, Messbarger L, Maitreyan V, Weisenburger DD, Sharp JG** (1990) Levels of detection of tumor cells in human bone marrow with or without prior culture, *Bone Marrow Transplantation* 6: 179-183

 - **Joshi SS, DeBoer JM, Strandjord SJ, Pirruccello SJ, Sanger WG, Weisenburger DD, Sharp JG** (1991) Characterisation of a newly established human Burkitt's lymphoma cell line, OMA-BL-1. *Int J Cancer* 47: 643-648

 - **Jung R, Krüger W, Hosch S, Holweg M, Kröger N, Gutensohn K, Wagener C, Neumaier M, Zander AR** (1998) Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro; *Br J Cancer* 78(9), 1194-1198

 - **Jung R, Petersen K, Krüger W, Wolf M, Wagener C, Zander A, Neumaier M** (1999) Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes, *Br J Cancer* 81(5): 870-873

 - **Jung R, Soondrum K, Krüger W, Neumaier M** (2001) Detection of micrometastasis through tissue-specific gene expression: its promise and problems. *Recent Results Cancer Res*; 158;32-9

-
- **Juttner CA, To LB, Ho JQK, et al.** (1988). Early lympho-hematopoietic recovery after autografting using peripheral blood stem cells in acute non-lymphoblastic leucemia. *Transplant Proc*; 20:40-43

 - **Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Sliwinska K, Neumann R, Schindler AE, Seeber S** (2001) Evaluation of different methods for the detection of minimal residual disease in blood and bone marrow of patients with primary breast cancer: importance for clinical use? *Breast Cancer Res Treat Sep*;69(2):123-132

 - **Kessinger A** (1993) High-dose therapy and peripheral blood stem cell transplants. In: Smith DM and Sacher RA (eds). *Peripheral Blood Stem Cells*. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks

 - **Kessinger A, Armitage J** (1991) The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. *Blood* 77 (2): 211-213

 - **Khoury IF, Keating MJ, Champlin R** (1998) Hematopoietic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol* 1998 Nov;5(6): 454-459

 - **Kiersnowska-Rogowska B; Rogowski F; Petelski T; Sawicka-Powierza J; Bodzenta-Lukaszuk A** (1997) Cytokines in certain proliferative diseases of the hematopoietic system . *Pol Merkuriusz Lek* Nov;3(17):258-60

 - **Kiesel S, Pezzutto A, Korbling M et al.** (1989) Autologous peripheral blood stem cell transplantation: Analysis of autografted cells and lymphocyte recovery. *Transplant Proc*;21 (1Pt.3):3084-3088

 - **Kohler G, Milstein C** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* Aug 7; 256 (5517): 495-497

 - **Korbling M, Dorken B, Ho AD et al.** (1986) Autologous transplantation of blood derived hematopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with

Burkitt's lymphoma. *Blood*; 67:529-532

- **Krismann M, Todt B, Schröder J, Gareis D, Müller K-M, Seeber S, Schütte J** (1995) Low specificity of Cytokeratin 19 Reverse Transcriptase Chain Reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination, *J Clin Oncol* 13, No 11: 2769-2775

- **Krüger W, Stockschräder M, Zander AR** (1994) Detection of epithelial specific RNA in blood and bone marrow with an RT-based polymerase chain reaction. *Proc Am Soc Clin Oncol* 13: 68

- **Krüger W, Stockschräder M, Hennings S, Aschenbrenner M, Gruber M, Gutensohn K, Löliger C, Giesecking F, Jonat W, Zander AR** (1996 a) Detection of cancer cells in peripheral blood stem cells of women with breast cancer by RT-PCR and cell culture, *Bone Marrow Transplant* 18 (suppl 1): 18-20

- **Krüger W, Krzizanowski C, Holweg M, Stockschräder M, Kröger N, Jung R, Mross K, Jonat W, Zander AR** (1996 b) Reverse transcriptase/polymerase chain reaction detection of cytokeratin-19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 679-686

- **Krüger W, Gruber M, Hennings S, Fehse N, Fehse B, Gutensohn K, Kröger N, Zander AR** (1998) Purging and progenitor cell selection by CD34⁺ cell-separation. *Bone Marrow Transplant* 21: 665-671

- **Krüger WH, Tögel F, Kröger N, Renges H, Arland M, Gutensohn K, Lindner C, Jänicke F, Zander AR** (1999 a) Disseminated tumour cells in breast cancer patients undergoing high-dose therapy. High-dose therapy and transplantation of hematopoietic stem cells: 34-38

- **Krüger W, Tögel F, Kröger N, Rossing S, Giesecking F, Gutensohn K, Lindner C, Janicke F, Zander AR** (1999 b) Tumour cell detection in G-CSF mobilised stem cell harvests of patients with breast cancer. *Med Oncol Apr*;16(1): 17-22

-
- **Krüger W, Jung R, Kröger N, Gutensohn K, Fiedler W, Neumaier M, Jänicke F, Wagener C, Zander AR** (2000) Sensitivity of Assays Designed for the Detection of Disseminated Epithelial Tumor Cells is influenced by Cell Separation Methods. *Clin. Chem*, Mar.;46.(3.): 435-436.

 - **Krüger WH, Kröger N, Tögel F, Renges H, Badbaran A, Hornung R, Jung R, Gutensohn K, Gieseck F, Jänicke F, Zander AR** (2001) Disseminated breast cancer cells prior to and after high-dose therapy. *J Hematother Stem Cell Res* 2001 Oct;10(5): 681-689

 - **Kvalheim G** (1996 a) Purging of autografts: methods and clinical significance, *Annals of Medicine* 28: 167-173

 - **Kvalheim G, Pharo A, Fodstad O, Holte H, Erikstein B, Nesland J, Smeland E, and Wang MY** (1996 b) Purging of breast cancer cells from leukapheresis products. 32st American Society of Clinical Oncology meeting

 - **Lane EB, Alexander CM** (1990) Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin Cancer Biol* (United States), Juni, 1(3): 165-179

 - **Levine M, Bramwell V, Pritchard K, Shepherd L** (1998) National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, Canada. *Eur J Cancer* 34 (suppl 1): .S.35

 - **Lister J, Pincus SM, Elder EM, et al.** (1993) Adoptive immunotherapy during peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation: Amplification of natural killer cell function early after transplant (abstract). *J Immunol*; 150 (Part II): 218A

 - **Luppi M, Morselli M, Bandieri E, Federico M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari MG, Savarino M, Frassoldati A, Torelli G** (1996) Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene. *Ann Oncol* 7: 619-624

 - **Mansi JL, Berger U, Easton D, McDonnell T, Redding WH, Gazet JC, McKinna A, Powles TJ, Coombes RC** (1987) Micrometastases in bone marrow in patients with

primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases. *Br Med J (Clin Res)* 295: 1093-1096

- **Mansi JL, Easton D, Berger U, Gazet JC, Ford HT, Dearnaley D, Coombes RC** (1991) Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years follow-up, *Eur J Cancer* 27(12): 1552-1555
- **McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ** (1971) Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science*; 171: 293-294
- **Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B** (1982) Catalogue of human cytokeratins. Pattern of expression in normal epithelia, tumours and cultured cells. *Cell*, 31: 11-24
- **Moll R, Schiller DL, Franke WW** (1990) Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol*; 111: 567-580
- **Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW** (1992) Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol.*, 140: 427-447
- **Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, Keith M, Laufer J, Kasper M, Koch PJ, Franke WW** (1993) The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation*; 53: 75-93
- **Moscinski LC, Trudeau WL, Fields KK et al.** (1996) High-sensitivity detection of minimal residual breast carcinoma using the polymerase chain reaction and primers for cytokeratin 19. *Diagn Mol Pathol (United States)*, Sep, 5(3) p173-80
- **Naume B, Borgen E, Beiske K, Herstad TK, Ravnas G, Renolen A, Trachsel S, Thrane-Stein K, Funderud S, Kvalheim G** (1997) Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow

- and peripheral blood, *J Hematother*, Apr;6(2): 103-14
- **Neumaier M, Gerhard M, Wagener C** (1995) Diagnosis of micrometastasis by the amplification of tissue-specific genes, *Gene* 159: 43-47
 - **Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H** (1996) Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Am J Pathol* Vol. 148 (2) Feb: 649-656
 - **Oruzzo D, Hempel D, Schlimok G** (1997) "Knochenmarksmikrometastasen" epithelialer Tumoren, *Der Onkologe* 1: 66- 72, Springer-Verlag
 - **Osborn M, Weber K** (1983) Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest (United States)*, Apr, 48(4): 372-394
 - **Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ** (1939) Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report, *Ann Intern Med*;13:357-367
 - **Pantel K, Felber E, Schlimok G** (1994) Detection and characterisation of residual disease in breast cancer. *J Hematotherapy* 3: 315-322
 - **Passos-Coelho J, Ross AA, Moss TJ et al.** (1995) Absence of breast cancer cells in a single day peripheral blood progenitor cell (PBPC) collection following priming with cyclophosphamid and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *Blood* 85: 1138
 - **Passos-Coelho JL, Ross AA, Kahn DJ, Moss TJ, Davis JM, Huelskamp AM, Noga SJ, Davidson NE, Kennedy MJ** (1996) Similar breast cancer cell contamination of single-day peripheral-blood progenitor-cell collections obtained after priming with hematopoietic growth factor alone or after cyclophosphamide followed by growth factor. *J Clin Oncol* Sep;14(9): 2569-2575
 - **Peris J, Ferrá C, Ancín I, Gallardo D et al.** (1996) Allogenic transplantation of

peripheral blood stem cells (PBSC) with positive selection of CD34+ cells. Description of 10 cases. L'Institute de recerca Oncologica Barcelona, Spain

- **Peters WP, Eder JP, Henner WD, Schryber S, Wilmore D, Finberg R et al.** (1986) High-dose combination alkylating agents with autologous bone marrow support: a phase I trial. *J Clin Oncol* 4: 646-654

- **Peters WP, Ross M, Vredenburgh JJ, Meisenberg B, Marks LB, Winer E, Kurtzberg J, Bast RCJ, Jone R, Shpall E** (1993). High-dose chemotherapy and autologous bone marrow support as consolidation after standard-dose adjuvant therapy for high-risk primary breast cancer. *J Clin Oncol* 11: 1132-1143

- **Peters WP** (1995) High-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation for the treatment of breast cancer: yes (Review) *Important Adv Oncol*: 215-230

- **Pigneux A, Mahon FX, Reiffers J** (1999) Autologous peripheral blood stem cell transplantation for chronic myelocytic leukaemia, using unmanipulated grafts. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, Mar; 12(1): 193-198

- **Radich J, Thomson B** (1997) Advances in the detection of minimal residual disease. *Curr Opin Hematol (United States)*, Jul, 4(4):242-247

- **Radich JP** (1999) The use of PCR technology for detecting minimal residual disease in patients with leukemia. *Rev Immunogenet (Sweden)*, 1(2):265-278

- **Rahman Z, Frye D, Buzdar A et al.** (1995) A retrospective analysis to evaluate the impact of selection process for high-dose chemotherapy (HDCT) on the outcome of patients with metastatic breast cancer (MBC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 14: p 95

- **Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ et al.** (1983) Detection of

- micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* Dec 3;2(8362):1271-4
- **Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ et al.** (1983) Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 2: 1271-1274

 - **Reiffers J, Trouette R, Marit G, Montastruc M, Faberes C, Cony-Makhoul P, David M, Bourdeau MJ, Bilhou-Nabera C, Lacombe F, Feulliatre F, Vezon G, Berard P and Broustet A** (1991) Autologous blood stem cell transplantation for chronic granulocytic leukemia in transformation: a report of 47 cases. *Brit J Hematol* 77: 339-345

 - **Richman CM, Chess L, Yankee RA** (1978) Purification and characterisation of granulocytic progenitor cells (CFU-C) from human peripheral blood using immunologic surface markers. *Blood*; 51: 1-8

 - **Rill DR, Santana VM, Roberts WM et al.** (1994) Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood* 84: 380-384

 - **Rodenhuis S, Bontenbal M, Beex LV, Wagstaff H, Richel DJ, Nooij MA, Voest EE, Hupperets P, van Tinteren H, Peterse HL, Ten Vergert EM, de Vries EG** (2003) High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for high-risk breast cancer. *N Engl J Med*, Jul 3;349(1): 7-16

 - **Rodenhuis S, de Vries EG** (1999) High-dose chemotherapy with stem cell support for solid tumors in adults. *Ned Tijdschr Geneesk* 1999 Apr 3; 143(14): 731-738

 - **Rodenhuis S** (2000) The status of high-dose chemotherapy in breast cancer. *Oncologist*;5(5):369-375

 - **Rodenhuis S** (2001) High-dose chemotherapy in breast cancer – interpretation of randomized trials. *Anticancer drugs* Feb;12(2): 85-88

-
- **Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, Tallman MS, Kennedy NJ, Davidson ME, Sweet D, Winter C, Akard L, Jansen J, Copelan E, Meagher RC, Herzig Rh, Klumpp TR, Kahn DG, Warner NE (1993)** Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunozytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 82 (9): 2605-2610

 - **Rowlings PA, Antman KH, Fay JW et al. (1997)** Prognostic factors for outcome of autotransplants in women with high.risk primary breast cancer. *Proc ASCO* 16: 177a

 - **Ruka W, Rutkowski P, Kaminska J, Rysinska A, Steffen J (2001)** Alterations of routine blood tests in adult patients with soft tissue sarcomas: relationships to cytokine serum levels and prognostic significance. *Ann Oncol*, Oct;12(10):1423-32

 - **Salzman DE, Briggs AD, Vaughan WP (1997)** Bone marrow transplantation for Non-Hodgkin's Lymphoma: a review. *Am Journal Med Sci* 313 (4): 228-235

 - **Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B (1997)** Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice. *J Immunol* , Feb 15;158(4):1887-94

 - **San Miguel JF, Martinez A, Macedo A et al. (1997)** Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood (United States)*, Sep 15 1997, 90(6):2465-2470

 - **Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H et al. (1987)** Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8673-8676

 - **Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J, Riethmüller G**

- (1991) Micrometastatic tumor cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance, *Eur J Cancer* 27(11): 1461-1465
- **Schneeweiss A, Goerner R, Hensel MA, Lauschner I, Sinn P, Kaul S, Egerer G, Beldermann F, Geberth M, Solomayer E, Grischke EM, Haas R, Ho AD, Bastert G** (2001) Tandem high-dose chemotherapy in high-risk primary breast cancer: a multivariate analysis and a matched-pair comparison with standard-dose chemotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant*;7(6): 332-342
 - **Schönfeld A, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, Shousha S, Sinnett HD, Coombes RC** (1994) Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction, *Cancer Research* 54: 2986-2990
 - **Schrama JG, Rodenhuis S** (1999) Dose-intensive chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Curr Oncol Rep*, Sep;1(1): 23-30
 - **Schulze R, Schulze M, Wischnik A, Ehle S, Doukas K, Behr W, Ehret W, Schlimok G** (1997) Tumor cell contamination of peripheral blood stem cell transplants and bone marrow in high-risk breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 19: 1223-1228
 - **Sharp JG, Kessinger MA, Pirruccello SJ et al.** (1991) Frequency of detection of suspected lymphoma cells in peripheral blood stem cell collections. In: Dicke KA, Armitage JO, Dicke-Evinger MJ, eds. *Autologous bone marrow transplantation. Proceedings of the Fifth International Symposium*. Omaha, NE: University of Nebraska Medical Center Press: 801-810
 - **Sharp JG, Joshi SS, Armitage JO, Bierman P, Coccia PF, Harrington DS, Kessinger A, Crouse DA, Mann SL, Weisenburger DD** (1992) Significance of detection of occult Non-Hodgkin's Lymphoma in histologically uninvolved bone marrow by a culture technique. *Blood* 79: 1074-1080
 - **Sharp JG, Kessinger A** (1993) Minimal residual disease and blood stem cell

transplantation. In: Gale RP, Henon P, Juttner C, eds. Blood stem transplants. Cambridge, UK: Cambridge University Press

- **Shiba E, Akazawa K, Kim SJ, Taguchi T, Tsukamoto F, Ogawa H, Furukawa J, Yamamoto H, Noguchi S** (2000) High dose chemotherapy as adjuvant treatment in operable breast cancer with ten or more involved axillary lymph nodes. *Breast Cancer*;7(4): 302-306

- **Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI, Franklin WA, Archer PG, Curiel T, Bitter M, Claman HN, Stemmer SM, Purdy M, Myers SE, Hami L, Taffs S, Heimfeld S, Hallagan J, Berenson RJ** (1994) Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: Influence of CD34-positive peripheral-blood progenitors and growth factors on engraftment. *J Clin Oncol* 12: 28-36

- **Sloane JP, Ormerod Mg, Neville AM** (1980) Potential pathological application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastasis. *Cancer Res* 40: 3079-3082

- **Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE** (1991) Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction, *Lancet* 338: 1227-1229

- **Soeth E, Vogel I, Röder C, Juhl H, Krüger U, Kremer B, Kalthoff H** (1996) The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal cancer patients by a cytokeratin 20-specific nested reverse transcription polymerase chain reaction is related to the stage of disease, *Int. J Cancer* 69: 278-282

- **Soeth E, Vogel I, Röder C, Juhl H, Marxsen J, Krüger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H** (1997) Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res.* 57: 3106-3110

- **Stadtmauer EA, O'Neill A, Goldstein LJ, Crilley PA, Mangan KF, Ingle JN, Brodsky I, Martino S, Lazarus HM, Erban JK, Sickles C, Glick JH** (2000) Conventional-dose chemotherapy compared with high-dose chemotherapy plus autologous hematopoietic stem-cell transplantation for metastatic breast cancer. Philadelphia Bone Marrow Transplant Group. *N Engl J Med*, Apr 13, 342(15): 1069-1076

- **Stewart PS** (1982) Autologous bone marrow transplantation in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*;2(1): 85-92

- **Sun TT, Bonitz P, Burns WH** (1984) Cell culture of mammalian thymic epithelial cells: growth, structural, and antigenic properties. *Cell Immunol (United States)*, Jan, 83(1): 1-13

- **Thomas ED, Storb R, Clift RA et al.** (1975) Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*; 292: 832-895

- **Thomas P, Battifora H** (1987) Keratins versus epithelial membrane antigen in tumor diagnosis: an immunohistochemical comparison of five monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 18: 728-734

- **Traweek ST, Liu J, Battifora H** (1993) Keratin gene expression in non-epithelial tissues, *Am J Pathol* 142(4): 1111-1118

- **Traystman MD, Cochran GT, Hake SJ, Kuszynski CA, Mann SL, Murphy BJ, Pirruccello SJ, Zuvanich E, Sharp JG** (1997) Comparison of molecular cytokeratin 19 reverse transcriptase polymerase chain reaction (CK19 RT-PCR) and immunocytochemical detection of micrometastatic breast cancer cells in hematopoietic harvests. *J Hematol*, Dec;6(6): 551-561

- **Ueno NT, Rondon G, Mirza NQ, Geisler GK, Anderlini P, Giralt SA, Andersson BS, Claxton GF, Gajewski JL, Khouri IF, Koerbling M, Mehra RC, Prkzepiorka D, Rahman Z, Samuels BI, van Besien K, Hortobagyi GN, and Champlin RE** (1998) Allogeneic peripheral-blood progenitor-cell transplantation for poor-risk

patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 16: 986-993

- **Vaughan WP, Reed EC, Edwards B, Kessinger A** (1994) High-dose cyclophosphamid, thiopeta, and hydroxyurea with autologous hematopoietic stem cell rescue: an effective consolidation chemotherapy regimen for early metastatic breast cancer. *Bone Marrow Transplant* 13: 619-624

- **Vredenburgh JJ, Silva O, Broadwater G, Berry D, De Sombre K, Tyler C, Petros WP, Peters WP, Bast RC** (1997) The significance of tumor contamination in the bone marrow from high-risk breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and hematopoietic support. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2: 91-97

- **Waage A and Steinshamn S** (1993) Cytokine mediators of septic infections in the normal and granulocytopenic host, *Eur J Haematol* 50: 243-249

- **Wang NP, Zee S, Zarbo RJ, Bacchi CE, Gown AM** (1995) Coordinate expression of cytokeratin 7 and 20 defines unique subsets of carcinomas. *Immunohistochemistry* 3(2): 99-107

- **Wasserman L, Dreilinger A, Easter D et al.** (1999) A seminested RT-PCR assay for HER2/neu: initial validation of a new method for the detection of disseminated breast cancer cells. *Mol Diagn (United States)*, Mar, 4(1): 21-28

- **Westerhausen M** (1995) Metastasierendes Mammakarzinom. In: Meuret G (Hrsg) *Mammakarzinom - Grundlagen, Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 2. überarb. und erw. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, S.136 und 142

- **Williams SF, Bitran JD, Richards JM, et al.** (1990). Peripheral blood-derived stem cell collections for use in autologous transplantation after high-dose chemotherapy: an alternative approach. *Bone Marrow Transplant*;5: 129-133

- **Williams SF, Gilewsky T, Mick R, Bitran JD** (1992) High-dose consolidation therapy with autologous stem cell rescue in stage IV breast cancer: follow-up report. *J*

Clin Oncol 10: 174

- **Wood WC, Budman DR, Korzun AH et al.** (1994) Dose and dose intensity of adjuvant chemotherapy for stage II, node-positive breast carcinoma. *New Engl J Med* 330: 1253-1259

- **Wulf GG, Jurgens B, Liersch T, Gatzemeier W, Rauschecker H, Buske C, Hufner M, Hiddemann W, Wormann B** (1997) Reverse transcriptase/polymerase chain reaction analysis of parathyroid hormone-related protein for the detection of tumor cell dissemination in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*;123(9): 514-521

- **Zander AR, Krüger W, Kröger N, Damon L, Koenigsmann M, Berdel WE, Giesecking F, Schäfer-Eckart K, Möbus V, Frickhofen N, Wandt H, Illiger HJ, Metzner B et al.** (1996) High dose mioxantrone with thiopeta, cyclophosphamide, and autologous stem cell rescue for high risk stage II and stage III breast cancer. German GABG-4/EH-93-Study. *Bone Marrow Transplant.* 18 (Suppl. 1): 24-25

- **Zander AR, Kröger N, Schmoor C, Krüger W, Möbus V, Frickhofen N, Metzner B, Schultze W, Berdel WE, Koenigsmann M, Thiel E, Wandt H, Possinger K, Trümper L, Kreienberg R, Carstensen M, Schmidt EH, Jänicke F, Schumacher M, Jonat, W** (2004) High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support compared with standard-dose chemotherapy in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes: first results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 22: 2273-2283

- **Zippelius A, Kufer P, Honold G, Köllermann MW, Oberneder R, Schlimok, Rietmüller G, Pantel K** (1997) Limitations of Reverse-Transcriptase Chain Reaction analysis for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow, *J Clin Oncol* 15, No 7: 2701-2708

8. Danksagung

Diese Dissertation entstand als Bestandteil der Forschungsarbeit der Einrichtung für Knochenmarktransplantation aus der Abteilung Hämatologie/Onkologie der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Ich danke sehr herzlich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. A.R. Zander für die freundliche Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich Herrn PD Dr. med. William Krüger für die gute Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit danken. Er war stets zu konstruktiver Diskussion und Anregungen bereit und stand auch nach seinem beruflichen Wechsel an eine andere Klinik weiterhin als Ansprechpartner zur Verfügung.

Frau Anita Badbahrn danke ich sehr für die kompetente Einführung in die molekular- und zellbiologischen Arbeitstechniken, die fortwährende Unterstützung in allen Bereichen der Laborarbeit und die Gelassenheit in allen Lebenslagen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Birte Detlefsen für die großartige Zusammenarbeit während der Entstehung unserer beider Doktorarbeiten, für ihre enge Freundschaft und für fachlichen und vor allem seelischen Beistand in allen Höhen und Tiefen während dieser Zeit.

Birte Detlefsen, Anja Lange, Chonda Datta, Anita Badbahrn, Jung Ung und Dr. rer. nat. Boris Fehse danke ich für die gute Zusammenarbeit, Kooperation und positive Arbeitsatmosphäre im Labor.

Weiterhin danke ich auch Britta Hempel und Simone Süßmilch, die mit mir Erfahrungen während dieser Zeit teilten und stets zu Gedankenaustausch und Unterstützung bereit waren.

In besonderem Maße möchte ich meinen Eltern danken, die mich auf alle erdenkliche Art und Weise während meiner gesamten Ausbildungszeit unterstützt und mir Bestätigung gegeben haben und ohne die diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

Ein ganz herzlicher Dank gehört auch meiner Zwillingsschwester Kathrin Mumme, die immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte für mich hatte, für interessante Diskussionen und kompetenten fachlichen Rat bei der Strukturierung dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich ganz besonders meinem Partner Fabian Wenzel danken, der mich unermüdlich während des Fortgangs dieser Arbeit unterstützte, unlösbar erscheinende Probleme bei der Erstellung des Layouts dieser Arbeit beseitigen half und vor allem immer für mich da war.

9. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Sandra Mumme
Geburtsdatum: 22.04.1974
Geburtsort: Hamburg

Schulbildung:

1980 – 1985: Vor- und Grundschule in Reinbek
1985 – 1994: Gymnasium in Glinde
Abitur mit Gesamtnote 2,1

Hochschulausbildung:

10.1994-02.1995: Einsemestriges Studium der Veterinärmedizin/
Tierärztliche Hochschule Hannover

04.1995-09.2000 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
Ärztliche Vorprüfung: Note 2,0
I. Medizinisches Staatsexamen: Note 3,0
Famulaturen: Innere Medizin, Chirurgie, Pädiatrie
(Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf und Indien),
Gynäkologie und Geburtshilfe, Anästhesie
II. Medizinisches Staatsexamen: Note 1,66

11.2000-10.2001 Praktisches Jahr
1. Terial: AK Altona (Chirurgie)
2. Terial: Altonaer Kinderkrankenhaus (Pädiatrie)
3. Terial: Tulane University/New Orleans (Innere Med.)

12.2001 III. Medizinisches Staatsexamen: Note 2,0
und Ärztliche Prüfung: Gesamtnote 1,99

Berufserfahrung:

- 12.2002-06.2003 Ärztin im Praktikum auf der neonatologischen
Intensivstation des Altonaer Kinderkrankenhauses in Hamburg
- 07.2003-09.2003 Assistenzärztin auf der neonatologischen
Intensivstation des Altonaer Kinderkrankenhauses in Hamburg
- 10.2003-04.2005 Assistenzärztin im Elisabeth-Kinderkrankenhaus des
Klinikums Oldenburg
- Seit 05.2005 Assistenzärztin in katholisches Kinderkrankenhaus
Wilhelmstift in Hamburg

Promotion:

- 11.1998- 2005 In der Einrichtung für Knochenmarktransplantation
des Universitäts-Klinikums Hamburg-Eppendorf
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. A.R. Zander
Publikation in: Onkologie 2000; 23 (Suppl. 7):58;
Cytotherapy 2000;2 (4): 315; J. Clinical Oncology 2000;
19 (Suppl. 1): 661a; Bone Marrow Transplant. 2000; 25
(Suppl. 1):57

Eigene Veröffentlichungen:**Artikel:**

- **Krüger WH, Jung R, Detlefsen B, Mumme S, Badbaran A, Brandner J, Renges J, Kröger N, Zander AR** (2000) Interference of Cytokeratin-20- and Mammaglobin-Reverse Transcriptase Polymerase Chain Assays Designed for the Detection of Disseminated Cancer Cells.

Veröffentlicht in:

- Onkologie 2000; 23 (Suppl. 7): 58
- Med. Oncology 2001; 18(1):33-38

Abstracts:

- **Detlefsen B, Mumme S, Badbaran A, Jung R, Neumaier M, Kröger N, Zander AR, Krüger WH.** Evaluation of Cytokeratin-20- and Mammaglobin-Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Detection of Disseminated Tumour Cells in Breast Cancer.

Veröffentlicht in:

- Cytotherapy 2000; 2 (4): 315
- J. Clinical Oncology 2000; 19 (Suppl. 1): 661a
- Bone Marrow Transplant. 2000; 25 (Suppl. 1): S57

Vorträge:

- Kasuistik – 14jähriges pakistanisches Mädchen mit Knochenschmerzen als Leitsymptom einer Immigranten-Rachitis. Küstenländertreffen. Hamburg Juni 2002
- Seltene Differentialdiagnose der hämorrhagischen Enteritis mit Subileus. Pädiatrischer Nachmittag. Oldenburg, Mai 2004

Poster:

Mumme S, Besecke A, Diemer AJ, Akkurt I. Die Immigranten-Rachitis: Leitsymptome und pathognomonische Röntgenbefunde bei neun Heranwachsenden. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Sozialpädiatrie und Jugendmedizin. Freiburg, Sept. 2001

S. Mumme, A. von der Wense. Corpus-callosum-Agenesie mit intracerebralem Lipom. Kongress der pädiatrischen und neonatologischen Intensivmedizin (GPNI). Köln, Aug. 2003

Hamburg, 20.06.2005

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.