

Michael Conzelmann
Dr. med.

Detektion abgeschilfter Tumorzellen kolorektaler Karzinome in Lymphknoten-, Leber- und Knochenmark-Proben: Evaluation und Vergleich der molekularen Marker K-ras, Cytokeratin 20 und Guanylylcyclase C

Geboren am 06.09.1973 in Ebingen (jetzt Albstadt)
Reifeprüfung am 14.05.1993 in Albstadt
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis SS 2003
Physikum am 23.03.1998 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 20.06.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Martin R. Berger

Die vorgelegte prospektive Studie befasst sich mit dem Nachweis von abgeschilferten Tumorzellen kolorektaler Karzinome in Lymphknoten-, Leber- und Knochenmark-Proben. Prä- und intraoperativ gewonnene Gewebeproben von insgesamt 246 Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden mittels eines PCR-RFLP-Assays auf Mutationen des K-ras Onkogens (Codons 12 und 13) sowie mit zwei unabhängigen RT-PCR-Assays auf die Präsenz von Cytokeratin 20 (CK20) und Guanylylcyclase C (GCC) mRNA untersucht. Beide Techniken waren in der Lage, eine mutierte bzw. epitheliale Zelle in einer Million Hintergrundzellen zu detektieren, wobei für den PCR-RFLP-Assay allerdings von einer regelhaften Sensitivität von lediglich einer mutierten in 10^4 Wildtyp-Zellen ausgegangen werden muss.

Die Prüfung der Spezifität der beiden RT-PCR-Assays ergab für CK20 positive Ergebnisse in 61% der Kontrollproben von Patienten ohne maligne Grunderkrankung. Im Gegensatz dazu wurde für GCC kein positives Ergebnis in den Kontrollproben beobachtet. In der weiteren Evaluation wurden Proben deshalb nur dann als "positiv" definiert, wenn beide epithelialen Marker gleichzeitig detektiert werden konnten.

K-ras Mutationen wurden in 37% der Primärtumoren beobachtet, wobei zu 82% das Codon 12 und zu 18% das Codon 13 betroffen war. Insgesamt 17% (16/92) aller Patienten mit K-ras mutiertem Primärtumor wiesen mindestens eine K-ras Mutation in unauffälligen Lymphknoten- oder Leberproben auf. Die Detektion mittels mutiertem K-ras hätte 2% (1/52) der als N0 und 7% (5/72) der als M0 eingestuft Patienten einem weiter fortgeschrittenen Stadium zugeordnet. In den K-ras positiven Gewebeproben wurden Mutationen des Typs Codon 12 GGT→GAT (59%) signifikant häufiger beobachtet als in allen mutierten Primärtumoren (26%; $p=0,01$). Insgesamt wurden G→A Mutationen der zweiten Base unabhängig vom Codon in mutierten Gewebeproben häufiger gefunden als in K-ras positiven Tumoren (65% vs. 45%). Dies deutet auf ein erhöhtes Metastasierungspotential von Tumoren mit dieser Mutationssequenz hin.

Die simultane Detektion von CK20- und GCC-mRNA gelang in 60% der paraaortalen Lymphknoten-Proben ($n=247$) ohne signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit (N1/2, 65%) und ohne (N0, 56%) nodalen Tumorbefall. Bei 45% der Patienten konnten beide Marker in mindestens einem Leberlappen nachgewiesen werden. Auch für die im Rahmen dieser Studie erstmalig untersuchte Serie unauffälliger Leberbiopsien ($n=403$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Detektionsraten bei Patienten mit (M1, 62%) und ohne (M0, 41%) Fernmetastasen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Funktion von Lymphknoten- und Lebergewebe als primäre Filter für abgeschilferte Tumorzellen kolorektaler Karzinome.

Die gemeinsame Auswertung der K-ras Codons 12 und 13 erbrachte für den Vergleich von Patienten mit mutierten bzw. Wildtyp-Primärkarzinomen keine Unterschiede hinsichtlich der CK20- plus GCC-Inzidenz in den zugehörigen Gewebeproben. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Lymphknoten von zugehörigen K-ras Codon 13 mutierten Primärtumoren eine signifikant höhere

CK20- plus GCC-Inzidenz (82%) als in der Gruppe mit K-ras Codon 12 Mutation (57%, $p < 0,05$) oder Wildtyp-Sequenz (59%, $p < 0,05$). Leberbiopsien von Karzinomen mit K-ras Codon 12 Mutation oder Wildtyp-Sequenz waren dagegen signifikant häufiger CK20 plus GCC positiv (31% bzw. 29%) als Proben von K-ras Codon 13 mutierten Tumoren (12%, $p < 0,04$). Dies könnte auf eine bevorzugte Streuung abgeschilfter Zellen von Tumoren mit Codon 13 Mutation in lymphatische Drainagekompartimente hindeuten.

Alle drei untersuchten Marker wurden einzeln (88-67%) und in verschiedenen Kombinationen (88-50%) in Leberbiopsien aus klinisch erkennbaren Metastasen signifikant häufiger detektiert als in unauffälligen Leberproben der M0-Studienpopulation ($p < 0,03$ für alle Vergleiche). Die Inzidenz der Einzelmarker (ausser GCC) oder ihrer Kombinationen war auch in klinisch unauffälligen Biopsien aus der direkten Umgebung der Metastasen signifikant höher als in klinisch unauffälligen Proben von M0-Patienten. Diese Ergebnisse verdeutlichen das Potential der einzelnen Marker und ihrer Kombinationen, tumoröses und CEC/DTC-infiltriertes Gewebe zu detektieren. Die Daten deuten zudem darauf hin, dass auch ein hoher Prozentsatz des klinisch unauffälligen, die sichtbare Metastase umgebenden Gewebes von abgeschilferten Tumorzellen infiltriert ist. Diese Zellen könnten nach Resektion der Metastase zur Entstehung eines hepatischen Rezidivs beitragen.

Vor allem eine Marker-Kombination nach dem Prinzip K-ras und/oder CK20 plus GCC könnte nach den vorliegenden Ergebnissen zur Früherkennung einer Hochrisiko-Patientengruppe beitragen. Bei dieser Kombination validieren sich die Ergebnisse der beiden epithelialen Marker gegenseitig. Für den Marker K-ras ermöglicht ein Vergleich der Mutationssequenzen in Gewebeprobe und Primärtumor eine Befundvalidierung. Dieses Vorgehen zeichnete sich in dieser Studie durch eine mit den Ergebnissen der einzelnen Marker vergleichbare Detektionsrate bei gleichzeitig verbesserter Spezifität aus.