

Jeannine Ariane Désirée Lacroix
Dr. med.

Etablierung von Methoden zum molekularbiologischen Staging über RT-PCR bei Patienten mit soliden Tumoren

Geboren am 30.03.1970 in Stuttgart
Reifeprüfung am 09.05.1989 in Stuttgart
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989/90 bis WS 1996/97
Physikum am 05.09.1991 an der Universität Tübingen
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 03.06.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. med. M. von Knebel Doeberitz

Die vorgestellte Arbeit sollte in unserer Arbeitsgruppe die Voraussetzungen für die Durchführung klinischer Studien zum sensitiven Nachweis einer hämatogenen oder lymphogenen Dissemination epithelialer Tumorzellen über RT-PCR schaffen. Besonderes Interesse galt hierbei Schilddrüsen, Mamma, kolorektalen und Bronchialkarzinomen. Dazu wurden zunächst Protokolle zur Separation vitaler Tumorzellen aus klinischen Proben wie Blut, Knochenmark oder Sputum etabliert und optimiert. Anschließend wurden verschiedene Protokolle für die Extraktion von RNA aus diesen Proben in unserem Labor etabliert und auf die unterschiedlichen Arten zu untersuchender klinischer Proben und die verschiedenen Probenvolumina adaptiert.

Parallel dazu wurden RT-PCR-Verfahren für Transkripte etabliert, die in der Literatur als differentiell in einer der zu untersuchenden Tumorentitäten (Schilddrüsenkarzinom, kolorektales Karzinom, Mammakarzinom und Bronchialkarzinom) exprimiert beschrieben waren. Da die Proteinexpression neben der Transkriptionsrate und der Transkriptstabilität einer Reihe zusätzlicher Regulationsmechanismen unterliegt, waren Daten über eine differentielle Expression auf Proteinebene nur als Anhalt für die differentielle Expression auf Transkriptebene zu werten. Um die Anwendbarkeit dieser RT-PCR-Verfahren für den Nachweis disseminierter Tumorzellen zu evaluieren, wurden Expressionsanalysen an Karzinomzelllinien und vergleichend dazu an peripheren Blutleukozyten gesunder Spender durchgeführt. Über Verdünnungsreihen von Karzinomzellen aus Zellkultur in Blutproben gesunder Spender wurden die RT-PCR-Bedingungen so weit optimiert, daß sofern möglich eine Nachweisgrenze von 10-100 Karzinomzellen in 10 ml Blut erzielt werden konnte. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde die Spezifität anhand von Negativkontrollproben erneut überprüft und geeignete Nachweisverfahren im Rahmen klinischer Fragestellungen weiter evaluiert.

Für follikuläre und papilläre Schilddrüsenkarzinome erwiesen sich die untersuchten Transkripte Thyreoglobulin und Natrium-Jodid-Symporter-mRNA zum Nachweis einer hämatogenen oder lymphogenen Tumorzeldissemination als ungeeignet. Nur für medulläre Schilddrüsenkarzinome und einen Teil der papillären Schilddrüsenkarzinome konnte mit einer CK20spezifischen RT-nested PCR ein hinreichend sensitiver und spezifischer Nachweis disseminierter Tumorzellen geführt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß medulläre Schilddrüsenkarzinomzellen in Blut sehr sensitiv über eine PräproGRP-spezifische RT-nested PCR nachweisbar sind.

Zum Nachweis disseminierter Mammakarzinomzellen wurden die beiden bereits in der Literatur beschriebenen Nachweisverfahren über CK-19- und Mammaglobin-spezifische RT-

nested PCR bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität evaluiert. Dabei wurde im Gegensatz zu widersprüchlichen Daten aus der Literatur eine hohe Spezifität bei ausreichender Sensitivität beobachtet. Deshalb werden diese beiden Nachweisverfahren in einer Studie zur vergleichenden Untersuchung von Blut und Knochenmarksproben von Patientinnen mit Mammakarzinom nach immunomagnetischer Tumorzellanreicherung eingesetzt.

Zum Nachweis disseminierter kolorektaler Karzinomzellen wurden drei RTPCR-Methoden etabliert und evaluiert: der Nachweis von HSP90 α -, PräproGRP- und CK20-mRNA. Von diesen dreien wurde jedoch nur die CK-20-RT-PCR mit einer in klinischen Studien eingesetzt. Dieses Nachweisverfahren hat in vitro eine Sensitivität von 10 Kolonkarzinomzellen in 10 ml Blut. Mit dieser Methode war es möglich, zirkulierende kolorektale Karzinomzellen in Blut, Knochenmark und Lymphknoten sensitiv und spezifisch nachzuweisen. Dabei konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß es bei etwa 40 % der Patienten mit primärem kolorektalem Karzinom und damit in deutlich höherem Maße als erwartet, zu einer prä- oder intraoperativen Tumorzellaussaat kommt. Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, die nach potentiell kurativer Tumorresektion histologisch tumorfreie Lymphknoten aufwiesen, konnten bei etwa einem Drittel der untersuchten Patienten nicht nur in den unmittelbar Tumor-drainierenden Lymphknoten, sondern sogar in den Lymphknoten am Stammgefäß disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden.

Der klinische Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Entwicklung von auf RTPCR basierenden Verfahren für die sensitive Diagnostik isolierter Bronchialkarzinomzellen sowohl in Blut als auch in Sputum. Dazu wurden RT-PCR-Verfahren für zwölf Transkripte, die als differentiell in Bronchialkarzinomzellen exprimiert beschrieben worden waren, auf ihre Anwendbarkeit zum Nachweis disseminierter Bronchialkarzinomzellen untersucht. Von diesen erwiesen sich sechs als potentiell geeignete Zielsequenzen. Darüber hinaus konnte mit PräproGRP-mRNA auch eine Zielsequenz identifiziert werden, deren Nachweis im Sputum spezifisch auf das Vorhandensein von abgeschilferten Bronchialkarzinomzellen hindeutet. Mit diesem Verfahren ließen sich reproduzierbar zwischen 10 und 100 kleinzellige Bronchialkarzinomzellen in 10 ml Blut oder 5 ml Sputum nachweisen. Zum Zeitpunkt der diagnostischen Bronchoskopie wurden Blut und Sputumproben von 175 Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose Bronchialkarzinom asserviert. Davon wurden bei 50 Patienten korrespondierende Blut und Sputumproben untersucht. Über eine Kombination von Blut und Sputumuntersuchung als nicht-invasiven diagnostischen Maßnahmen konnten zwei Drittel der untersuchten Tumorpatienten zum Zeitpunkt der klinischen Diagnosestellung identifiziert werden. Im Gesamtkollektiv von 175 Patienten waren bei der Hälfte der Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom sowie bei etwa einem Viertel der Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom zum Zeitpunkt der klinischen Diagnosestellung zirkulierende Tumorzellen im Blut nachweisbar. Um die prognostische Bedeutung dieser Ergebnisse abschätzen zu können, wurden die Studienpatienten im Mittel 36 Monate nachbeobachtet. Dabei ergab sich für Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom keine prognostische Bedeutung eines Nachweises von disseminierten Bronchialkarzinomzellen im Blut. Bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom war die mediane Überlebenszeit der Patienten bei nachgewiesener hämatogener Tumorzell dissemination zwar deutlich, aufgrund des kleinen Patientenkollektivs aber nicht signifikant verkürzt.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden methodische Grundlagen für den sensitiven Nachweis disseminierter Karzinomzellen über RT-PCR etabliert und evaluiert. So wurde die Grundlage für eine Reihe von Studien zum molekularbiologischen Staging bei Patienten mit malignen Erkrankungen der Schilddrüse, der Blase, der Brustdrüse, des Dickdarms und der Lunge gelegt. Insbesondere wurde ein sensitives und spezifisches Verfahren zur Diagnostik isolierter Bronchialkarzinomzellen in Blut oder Sputum entwickelt, sowie dessen diagnostische Wertigkeit gezeigt und die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Prognose der Patienten überprüft.