

Lars Helmstädter  
Dr. med.

## **Mikrometastasennachweis beim Prostatacarcinom mittels Reverser-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Geboren am 07.05.1969 in Eberbach.  
Reifeprüfung am 19.05.1988 in Heidelberg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/92 bis SS 1999  
Physikum am 27.08.1993 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Pforzheim  
Staatsexamen am 04.05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. G. Opelz

Das Prostatacarcinom hat während der letzten zwei Jahrzehnte vor allem in den westlichen Industrienationen deutlich an Bedeutung gewonnen. Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Mikrometastasen eines Prostatacarcinoms in Blut und Knochenmark zum prä- und postoperativen Staging. Mit einer RT-PCR sollten die Marker PSA und PSM untersucht werden. In einer Nachuntersuchung des Patientenverlaufs sollte ausserdem die klinische Relevanz von Mikrometastasen eruiert werden. Zunächst wurden unterschiedliche Verfahren für RNA- bzw. mRNA-Isolation, Reverse Transkription und PCR mit wechselndem Erfolg ausprobiert. Auch wurden verschiedene Oligonukleotid-Primers getestet. Zum Testen und Optimieren der Methode wurden zunächst Zellen der Tumorzelllinie DU-145, später der Linie LNCaP und auch Patientenproben verwendet. Mit der optimierten Methode wurden dann Proben von Patienten und Kontrollen getestet.

Untersucht wurden 39 Blut- und 30 Knochenmarkproben von 34 Patienten mit histologisch gesichertem Prostatacarcinom. Hiervon zeigten 26 Patienten bereits ein organüberschreitendes Tumorstadium im Stadium T3 oder höher. 12 Patienten hatten zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits bekannte Lymphknoten- oder Fernmetastasen. Zum Nachweis einer eventuellen Tumorzellaussaat während der Operation, wurden bei 3 Patienten prä- und postoperative Blutproben und bei 6 Patienten prä- und postoperative Knochenmarkproben untersucht. Als Kontrollen dienten 30 Blutproben von 9 weiblichen und 18 männlichen Personen. Aus Voll- bzw. Knochenmarkblut wurde zunächst die Lymphozytenfraktion isoliert, in welcher sich auch die Tumorzellen befinden. Aus dieser Zellfraktion wurde die Gesamt-RNA isoliert, durch eine DNA-Digestion von möglichen Verunreinigungen befreit und während der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. In einer PCR mit anschließender Nested-PCR wurde diese dann durch spezifische Oligonukleotid-Primers millionenfach vervielfältigt und danach auf einem Agarose-Gel detektiert. Zur Qualitätssicherung der Methode dienten 6 Sensitivitätsstandards mit exakt definiertem cDNA-Gehalt sowie verschiedene Negativkontrollen.

Insgesamt wurde bei 7 (21%) Patienten in Blut und/oder Knochenmark PSA und/oder PSM mRNA nachgewiesen. 15% der Patienten waren PSA-positiv, 12% PSM-positiv und 6% sowohl PSA- als auch PSM-positiv. Alle 7 Patienten zeigten bereits ein

histologisch gesichertes organüberschreitendes Tumorwachstum im Stadium T3 oder höher. In den Blutproben konnte bei 6% der Patienten PSA, bei 3% PSM und bei 0% PSA und PSM nachgewiesen werden. Bei Auswertung von Knochenmarkproben zeigten 21% der Patienten ein positives Ergebnis, entsprechend 13% für PSA, 17% für PSM und 8% sowohl für PSA als auch für PSM. Bei 22 Patienten wurden sowohl Blut- als auch Knochenmarkproben getestet. Nur bei 1 Patient fiel das Ergebnis in Blut und Knochenmark positiv aus, wobei die Blutprobe dieses Patienten lediglich für PSM ein positives Testergebnis zeigte. Bei den Patienten mit prä- und postoperativer Probenentnahme ergab sich weder im Blut noch im Knochenmark ein Hinweis für eine Tumorzellaussaat durch die Operation. Bei 9 Patienten war zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits eine Fernmetastasierung bekannt, davon waren 2 positiv getestet worden. Alle 9 Patienten waren zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung bereits verstorben. Bei 3 weiteren Patienten trat im Nachbeobachtungszeitraum eine gesicherte Fernmetastasierung auf, 2 dieser Patienten waren zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung bereits verstorben. Bei 2 der 3 Patienten waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits Lymphknotenmetastasen bekannt. Bei keinem der Patienten mit neu aufgetretener Fernmetastasierung waren in unseren Tests vor der Operation PSA- oder PSM-exprimierende Einzelzellmetastasen nachweisbar. Alle Tests der Kontrollpersonen fielen negativ aus.

Es steht somit eine potente Methode zum Nachweis einer Mikrometastasierung zur Verfügung. Bei der Methodenentwicklung und -optimierung und den Tests mit Patientenproben zeigte sich eine deutlich schwankende Sensitivität der PCR-Ansätze trotz unveränderter Testprotokolle. Außerdem ist die Methode sehr anfällig für Verunreinigungen durch fremde DNA und RNA. Gleichbleibende Qualität kann nur durch Sensitivitätsstandards und Negativkontrollen gewährleistet werden. Insgesamt waren PSA und PSM gleichwertige Marker bei der Erkennung einer Mikrometastasierung. Die Untersuchung von Knochenmarkblut erscheint im Vergleich zu Vollblut sensitiver, hier ist PSM dem PSA als Marker überlegen, was die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Insgesamt erscheint lediglich die Auswertung von Knochenmarkproben sowohl auf PSA als auch auf PSM sinnvoll. Ein eindeutiger Zusammenhang besteht zwischen dem Ausbreitungsstadium des Tumors und einer Mikrometastasierung, wohingegen ein positives Testergebnis keine Fernmetastasierung im weiteren Verlauf vorauszusagen vermag. Für PSA- und PSM-PCRs aus Blut oder Knochenmark ergeben sich in Bezug auf das Tumorstadium ausnahmslos positive Vorhersagewerte von 100% bei einer Spezifität von ebenfalls 100%. Dies bedeutet, positive PCR-Ergebnisse zeigen in unserem begrenzten Patientengut immer ein organüberschreitendes (= positiver Vorhersagewert von 100%) und nie ein organbegrenztetes Tumorwachstum (= Spezifität von 100%) an. Die Sensitivität schwankt jedoch zwischen 4% (Blutproben, PSM) und 28% (Knochenmarkproben, PSA/PSM). Der negative Vorhersagewert liegt zwischen 26% (Blutproben, PSM) und 32% (Knochenmarkproben, PSA/PSM). Um diese Ergebnisse zu überprüfen, sind weitere Studien mit Langzeitverläufen und deutlich höheren Patientenzahlen notwendig. Aus den Ergebnissen könnten sich Konsequenzen für das präoperative Staging und die Therapie ergeben.