

Alexandra Pia Felicitas Leitz  
Dr. med.

## **Entwicklung einer Duplex-RT-PCR zum Nachweis von Mammaglobin 1 und Prostata-Transkriptionsfaktor ETS in zirkulierenden Tumorzellen bei Patientinnen mit Mammakarzinom**

Geboren am 15.07.80 in Heidelberg  
Staatsexamen am 03.08.2007 an der Ruprecht-Karls Universität in Heidelberg

Promotionsfach: Frauenheilkunde  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. habil. N. Fersis

Auf Grund der frühzeitigen Disseminierung von Mammakarzinomzellen in die Blutbahn, ist das Mammakarzinom als eine systemische Erkrankung aufzufassen und zu behandeln. Molekulare, brustkrebspezifische Marker können dazu dienen, vom Primärtumor ausgehende disseminierte Tumorzellen aus dem peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen aufzuspüren. Mit Hilfe einer neuen immunmagnetischen Anreicherungsmethode ist es dabei möglich, diese zirkulierende Tumorzellen zu isolieren und anschließend einer molekularbiologischen Analytik ihrer mammakarzinomassoziierten Marker zu unterziehen.

Mittels eines kommerziell erhältlichen Standardtestkits (Firma Adnagen) werden dabei die Tumorzellen anhand von antikörperbeladenen Magnetbeads aus dem Blut isoliert und daraufhin im Rahmen einer Multiplex-RT-PCR auf ihre Genexpression hin analysiert. Bei den mammakarzinomassoziierten „Standardmarkern“ handelt es sich hierbei um MUC-1, HER-2 und EpCAM.

Diese Untersuchungen wurden an der Universitätsfrauenklinik Heidelberg im Zeitraum von Februar 2004 bis Februar 2006 bei einem Gesamtkollektiv von 201 Mammakarzinompatientinnen durchgeführt. Mit deren Einverständnis und nach Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg wurden den Patientinnen im Rahmen ihrer Primäroperation 10 ml peripheren EDTA-Blutes entnommen. Mit Hilfe der MUC-1- und EpCAM-konjugierten Antikörper und einer Magneteinheit konnten dann daraus die Tumorzellen separiert werden. Die Sensitivität des Tests liegt dabei bei zwei Tumorzellen in 5 ml Blut. Anschließend erfolgte die m-RNA-Isolierung und die Reverse Transkription in einem Thermocycler zur cDNA-Gewinnung. Durch diesen Schritt konnte eine cDNA-Bank der Patientenproben entwickelt werden, auf welche dann im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffen wurde. Anschließend erfolgte die Basisgenexpressionsanalyse der Standardmarker anhand eines Multiplex-PCR-Ansatzes. Dabei wurden mit Hilfe eines Primermixes aus dem Testkit die Marker MUC-1, HER-2 und EpCAM sowie b-Actin als Kontrollgen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels Mikrofluidgelelektrophorese im DNA 1000 LabChip des „Bioanalyzer Agilent 2100“ (Agilent Technologies) analysiert und semi-quantitativ ausgewertet. Der Test wurde dann als positiv erachtet, wenn mindestens eines der tumorassoziierten Transkripte nachgewiesen werden konnte.

Die Validierung des Tests erfolgte durch die Untersuchung von 103 Blutproben gesunder Spender aus der Blutspendezentrale Heidelberg, welche alle demselben Test unterzogen wurden. Dabei ergaben sich nur in zwei Fällen positive Ergebnisse, was einer Spezifität von 98% entspricht.

Anhand der Standardmarker wurde im Gesamtkollektiv der Patientinnen eine Positivitätsrate von 17,4% ermittelt. Es konnte eine deutliche Heterogenität in der Markerexpression festgestellt werden. In 66% der Fälle wurde dabei nur ein einzelner Marker nachgewiesen, 34% der Fälle zeigten positive Ergebnisse in mehreren Markern. MUC-1 war mit 80% der am häufigsten vertretene Marker, während HER-2 in 40% und EpCAM in 23% nachgewiesen werden konnten. Auch zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse in den einzelnen Untergruppen, wobei die Positivitätsrate in der nodal positiven Gruppe bei 17% lag, in der nodal negativen Gruppe sogar bei 18% und in der neoadjuvant behandelten Gruppe immer noch bei 16%. Diese Gruppe der zuvor als positiv selektierten Proben wurden anschließend benutzt, um sie einer Feinanalyse mit Hilfe der neuen Zusatzmarker zu unterziehen. Die zu diesem Zweck ausgewählten neuen Marker waren Mammaglobin 1 und Prostata-Transkriptionsfaktor ETS. Beide stellen viel versprechende neue mammarkarzinomassoziierte Antigene dar. Bei Mammaglobin handelt es sich um ein neues brustkrebsassoziiertes Glykoprotein, welches zu den Uteroglobinen gehört, einer Familie epithelialer sekretorischer Proteine bisher unbekannter Funktion. Es zeigte sich, dass sich seine Expression weitgehend auf die Brustdrüse beschränkt, wobei es auch in Brustkrebszelllinien und primärem Mammarkarzinomgewebe hochgradig exprimiert wird. In einigen vorausgegangenen Studien wurde der Mammaglobinnachweis mittels RT-PCR als eine spezifische Untersuchung zur Identifikation okkulten Krebszellen im peripheren Blut an Brustkrebs erkrankter Patienten bewertet und Mammaglobin als ein viel versprechendes, nützliches und nichtinvasives Werkzeug zum Brustkrebsnachweis erklärt. Bei PSE handelt es sich um ein Ets-Gen. Diese kodieren für eine Familie von Transkriptionsaktivatoren, die wiederum eine Schlüsselrolle bei Vorgängen wie Zellproliferation und Apoptose spielen. Während es in Prostatakarzinomen überexprimiert ist, wurde es in einigen Studien nun auch als neuer informativer Marker zum Brustkrebsnachweis bestätigt.

Um nun auch die Expressionslevel dieser neuen und viel versprechenden zusätzlichen mammarkarzinomassoziierten Gene untersuchen zu können, wurden spezifische Primer ausgewählt, die genau diese Genabschnitte amplifizieren können, und damit eine Duplex-PCR entwickelt. Diese wurde aus einer zunächst durchgeführten nested-PCR mit jeweils vier Primern pro neuen Marker später zusammengefasst. Anschließend erfolgte auch hier die Analyse und semiquantitative Auswertung mittels Mikrofluidgelelektrophorese im DNA 1000 LabChip des „Bioanalyzer Agilent 2100“ (Agilent Technologies). Während Mammaglobin zwar vertreten war, jedoch im Gegensatz zu den Standardmarkern mit 3% weitaus geringere Positivitätsraten aufweisen konnte, erreichte PSE durchaus Detektionsraten in der Größenordnung der zuvor getesteten Marker und konnte mit 19% sogar noch etwas höhere Werte vorweisen. Auch hier zeigten sich Unterschiede in den diversen Untergruppen, so dass die lymphknotenpositive Gruppe keine positiven Ergebnisse aufzuweisen hatte, bei der lymphknotennegativen Gruppe Positivitätsraten von 28% ermittelt werden konnten und die neoadjuvant behandelten Patientinnen auch Detektionsraten von 20% zeigten. Auch hier stellte sich also wieder deutlich die Heterogenität der Genexpression dieser Tumorzellen dar. Mammaglobin und PSE können also als viel versprechende neue Marker zum Nachweis zirkulierender Mammarkarzinomzellen aus peripherem Blut erkrankter Patientinnen beitragen. Ihre prognostische und klinische Relevanz spiegelt sich in der Information zum heterogenen Wachstumsverhalten durch die Erweiterung des Expressionsmusters und in der Möglichkeit sie als Targets für weitere Therapieoptionen sowie zum Therapiemonitoring anzusehen.