

5-års oppgave stadium IV – medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø.

Oppgavetittel:

**Utvikling av metode for påvisning av sirkulerende
brystkreftceller i perifert blod.**

Student: Gunn-Marit Lynghaug.

Veileder: professor dr.med. Anne Husebekk.

Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i
Tromsø/

Avdeling for Immunologi, Institutt for Medisinsk Biologi, Universitetet i
Tromsø.

Vår/høst 2005

Innholdsfortegnelse

<i>Innholdsfortegnelse</i>	1
<i>Resymé</i>	3
<i>Forkortelser</i>	4
<i>1. Introduksjon</i>	5
1.1. Brystkreft forekomst og årsaker	5
1.2. Brystkreft og stadielinndeling	9
1.3. Histopatologisk diagnose, prognose og behandling av brystkreft	12
1.4. Brystkreft og overlevelse	13
1.5. Brystkreft og mikrometastatisk sykdom	13
1.6. Mikrometastatisk sykdom og prognose	15
1.7. Anrikningsprosedyre	16
1.8. Real time PCR	18
1.9. Gen markører	23
1.10. Formål	25
<i>2. Materiale og metoder</i>	26
2.1. Cellelinjer	26
2.1.1. Dyrkning av celler	26
2.1.2. Nedfrysing av celler	26
2.1.3. Tining av celler	27
2.1.4. Celletelling	27
2.2. Blodprøver	27
2.3. Isolering av mononukleære celler (MNC)	28
2.4. Anrikningsprosedyre	28
2.6. cDNA syntese	30
2.7. Real time PCR	31
<i>3. Resultater</i>	34
<i>Metodeoptimalisering</i>	34
3.1. Bruk av DNase for å unngå amplifikasjon av pseudogener	34
3.2. Optimalisering av primere og prober	34
3.3. Fjerning av leukocytter i forbindelse med anrikningsprosedyren	35
3.4. Beregning av kontaminerende WBC etter anrikning	36
3.5. Effektivitetsstudie	36
3.5.1. RNA – isolering	37
3.5.3: Oppkonsentrering av cDNA	38
3.5.4: Anrikning med eller uten ammoniumkloridlysering av røde blodceller	40
3.6. cDNA syntese; sammenligning av to ulike kit for revers transkriptaser; Omniskript revers transcriptase versus Superscript RT	41
3.7. Spiking forsøk med 10 MDA MB 468 celler i 5ml NPB	42
3.8. Standardkurve basert på 10 fold fortykning av kreftceller i normalt blod.	43

3.9. Optimalisering av antall kuler i forbindelse med anrikningssteget.	44
3.10. Undersøkelser av blodprøver fra kvinner med metastatisk brystkreftsykdom.	45
3.10.1. Standardkurver med klonet materiale for de tre transkriptene; CK19, EGF-R og B2M.	46
3.10.2. Resultater av analyse av blodprøver fra 12 kvinner med metastatisk brystkreftsykdom	51
4. Diskusjon	54
4.1. Testing av friske blodgivere, hvor spesifikk er analysen?	54
4.2. Evaluering av effektivitet i de ulike analysetrinnene.	56
4.2.1. Anrikningsprosedyre.	56
4.2.2. RNA-isolering.	57
4.2.3. RT-reaksjon og tillaging av cDNA.	57
4.2.4. Etanolfelling; oppkonsentreringsprosedyre.	58
4.3. Spikingforsøk, en vurdering av metodens sensitivitet.	59
4.4. Analysering av blodprøver fra 12 kvinner med metastatisk brystkreftsykdom	61
5. Oppsummering og konklusjon	63
Referanseliste	65

Resymé

Brystkreft er den hyppigste kreftformen blant kvinner i Norge og i den øvrige vestlige verden, og utgjør omlag 23 % av alle krefttilfeller hos norske kvinner. Det finnes ingen sikker kunnskap om årsaken(e) til brystkreft, og mulighetene til forebygging er begrensede. De viktigste etablerte prognostiske faktorer er tilstedeværelse av aksillære lymfeknutemetastaser, tumorstørrelse og histologisk gradering og tilstedeværelse av østrogen- og progesteron reseptorer. Hos noen pasienter med brystkreftsykdom, kan det påvises sirkulerende brystkreftceller i ulike stadier av sykdommen. Noen av kvinnene med små og lokaliserte brystkrefttumorer uten lymfeknutemetastaser i axillen, vil oppleve recidiv flere år etter initiell behandling. Årsaken kan være at tumorceller unnslipper lokal og adjuvant behandling og spres lymfo- eller hematogent. Sirkulerende brystkreftceller representerer mikrometastatisk sykdom, dvs. sykdom som klinisk ikke kan påvises ved hjelp av klinisk undersøkelse, CT (computer tomografi) eller MR (magnetic resonance). Det knytter seg stor interesse til utvikling av teknikker som kan påvise disse sirkulerende cellene og bidra til en vurdering av metodenes kliniske betydning. Forskning har vist at deteksjon av isolerte brystkreft-tumorceller i beinmarg er en uavhengig prognostisk faktor som predikerer recidiv av sykdommen og negativt utfall med hensyn til overlevelse. Formålet med arbeidet vårt har vært å utvikle en sensitiv og spesifikk metode for påvisning av sirkulerende brystkreftceller i perifert blod. Beinmargaspirasjon medfører ubehag, og er en tidkrevende prosedyre som må foregå i sykehus, sammenlignet med blodprøvetagning som er enkelt, lite ubehagelig og kan foregå på ethvert legekantor. Vår metode kombinerer en positiv anrikningsprosedyre basert på monoklonale antistoffer bundet til magnetiske kuler rettet mot EpCAM på brystkreftcellene i perifert blod, og en real time PCR metode basert på påvisning av to ulike transkripter, EGF-R og CK19 som har forhøyet ekspresjon i en stor andel av brystkreftceller. Det har vært gjort forsøk hvor brystkreftceller har blitt tilsatt blod fra blodgivere, for å mimikere pasientprøver, mhp spesifisitet og sensitivitet. Metoden har også vært benyttet til å analysere blodprøver fra kvinner med brystkreftsykdom.

Forkortelser

APRT	adeninephosphoribosyl transferase
ATCC	American type culture collection
β_2 M	beta-2 microglobulin
cDNA	complementary deoxyribonucleicacid (komplementært deoxyribonuklein syre)
CEA	carcino embryonalt antigen
CK 19	cytokeratin 19
C_t -verdi	cycle threshold verdi (terskel verdi)
EDTA	ethylene diamine tetra-acetic acid
EGF-R	epidermal growth factor receptor (epidermal vekst faktor reseptor)
EpCam	epithelial cell adhesion molecule (epitelialt celleadhesjonsmolekyl)
MAM	mammaglobin
MNC	mononuclear cells (mononukleære celler)
mRNA	messenger ribonucleicacid (ribonuklein syre)
PIP	phosphoinositol phosphat (fosfoinositol fosfat)
RQ-PCR	real-time quantitative polymerase chain reaction (real time kvantitativ PCR)
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction (revers transkripsjon polymerase kjedereaksjon)
WBC	white blood cells (hvite blod celler)

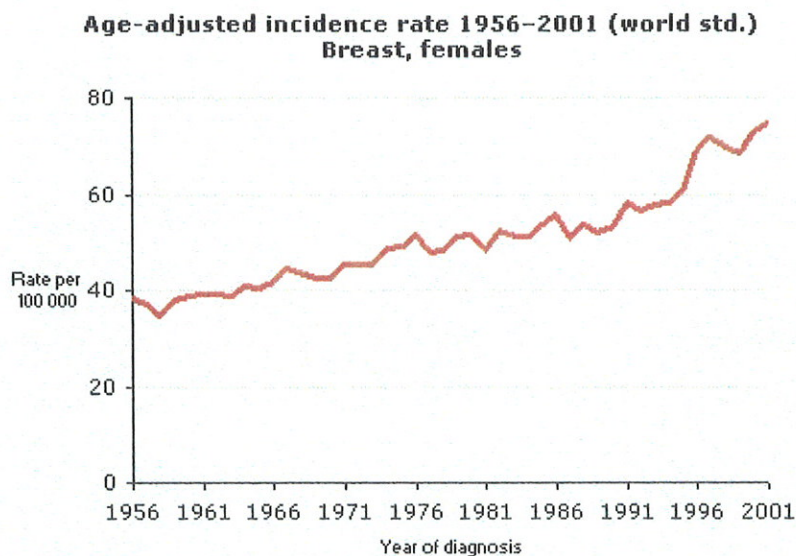
1.Introduksjon

1.1.Brystkreft forekomst og årsaker

Brystkreft er den hyppigste kreftformen blant kvinner i Norge og i den øvrige vestlige verden, og utgjør omlag 23 % av alle krefttilfeller hos norske kvinner. I år 2000 fikk 2503 norske kvinner diagnosen brystkreft. I 1970 fikk bare 1235 kvinner denne diagnosen.

Aldersjusterte insidensrate har økt fra 37.3 per 100 000 i perioden 1956-60 til 70.2 per 100 000 i perioden 1996-2000 (1,2) (Figur 1).

Incidence



Figur 1: Insidens av brystkreft hos norske kvinner. (Illustrasjon hentet fra Kreftregisterets nettsider;http://www.kreftregisteret.no/frame.htm?forekomst_og_overlevelse_2001/breast/incidence.htm)

Brystkreft rammer primært kvinner over 50 år. Bare 5 % (129) av nye tilfeller i Norge inntraff hos kvinner under 40 år i år 2000. Brystkreft utgjør imidlertid 24 % av nye krefttilfeller hos kvinner i alderen 20 til 40 år.

Det finnes idag ingen sikker kunnskap om årsakene til kreftsykdommen, men risiko er knyttet til arv, hormonelle- og sosioøkonomiske forhold, høyde og vekt. Hormonelle forhold som økt østrogen påvirkning i forbindelse med tidlig menstruasjon, sen førstegangsfødsel, barnløshet og sen overgangsalder øker risikoen for brystkreft (1) (Figur 2).

Det er vist geografiske forskjeller med hensyn til insidensrate og dødelighet av brystkreft. Forekomsten er høyere i USA og i nord-europeiske land sammenlignet med asiatiske og afrikanske land. Dette er forhold som sannsynligvis bærer i ulikheter i miljømessige forhold og skyldes sannsynligvis ikke genetiske faktorer. Dette kan man si fordi man har observert at emigranter fra lavinsidens land etter flytting til høyinsidens land har samme risiko for å få brystkreft som de innfødte kvinnene og vice versa (3).

Økt endogen østrogenpåvirkning er en av de viktige risikofaktorene som nevnt over. Eksogent tilført østrogen brukt i mer enn 5 år, er hevdet å gi økt risiko for brystkreft. Befolkningsstudier har vist at andre livsstilfaktorer som sigarett-røyking, overvekt, alkoholforbruk og fettrik diett kan bidra til økt risiko for brystkreft. I en studie fra 2000 konkluderer Thune og Smeland i en artikkel i Tidsskriftet, at en livsstilsfaktor som fysisk aktivitet, har en sannsynlig beskyttende effekt mot brystkreft (4).

Positiv familiehistorie er en etablert risikofaktor for brystkreft. En førstegradsslektning (mor, søster, datter) med brystkreft gir opp til dobbelt risiko (2). Brystkreft i fars slekt er også av betydning. Risikoen er høyere ved bilateral sykdom og/eller lav diagnosealder. 15-20% av brystkreftpasientene har positiv familiehistorie for sykdommen. 5-10 % av brystkreftpasientene har en familiehistorie forenlig med autosomal dominant arvegang og benevnes hereditære. BRCA1 og 2 (bryst cancer gen 1 og 2) koder for proteiner som er

involvert i reparasjon av DNA-skade. Mutasjoner i BRCA1 og 2 påvises i en betydelig andel av de hereditære tilfellene. Alle mutasjonsbærere utvikler imidlertid ikke kreft. Det er i dag begrensede muligheter til forebygging av brystkreft. Men for å oppdage brystkreft tidligst mulig, er mammografi en viktig undersøkelse. Alle kvinner mellom 50-69 år har siden høsten 2003 fått tilbud om mammografi undersøkelse hvert andre år i Norge.

Table 1 Summary of breast cancer risk factors

Factors that increase breast cancer risk		
Breast Cancer Risk Factors		Magnitude of risk
	Increasing age	++
	Geographical region (USA and western countries)	++
	Family history of breast cancer	++
	Mutations in BRCA1 and BRCA2 genes	++
	Mutations in other high-penetrance genes (p53, ATM, NBS1, LKB1)	++
	Ionizing radiation exposure (in childhood)	++
	History of benign breast disease	++
Well-confirmed factors	Late age of menopause (>54)	++
	Early age of menarche (<12)	++
	Nulliparity and older age at first birth	++
	High mammographic breast density	++
	Hormonal replacement therapy	+
	Oral contraceptives recent use	+
	Obesity in postmenopausal women	+
	Tall stature	+
	Alcohol consumption (<1 drink/day)	+
	High insulin-like growth factor I (IGF-I) levels	++
Probable factors	High prolactin levels	-
	High saturated fat and well-done meat intake	-
	Polymorphisms in low-penetrance genes (see text)	-
	High socioeconomic status	-
Factors that decrease breast cancer risk		
	Geographical region (Asia and Africa)	--
	Early age of first full-term pregnancy	--
	Higher parity	--
Well-confirmed factors	Breast feeding (longer duration)	--
	Obesity in premenopausal women	-
	Fruit and vegetables consumption	-
	Physical activity	-
Probable factors	Chemopreventive agents	-
	Non-steroidal anti-inflammatory drugs	-
	Polymorphisms in low-penetrance genes (see text)	-

++ (moderate to high increase in risk); -- (moderate to high decrease in risk);
 + (low to moderate increase in risk) - (low to moderate decrease in risk)

Figur2. Risikofaktorer for brystkreft.(hentet fra <http://www.jcmm.org/en/pdf/9/1/jcmm009.001.20.pdf>)

Forklaring til tekst: ++ moderat til høy økning i risiko for å få brystkreft.

+ lav til moderat økt risiko for å få brystkreft.

-- moderat til stor nedsatt risiko for å få brystkreft.

-lav til moderat nedsatt risiko for brystkreft.

1.2.Brystkreft og stadieinndeling

Brystkreft kan deles inn i fire ulike stadier, og stadieinndeling tar utgangspunkt i Tumor, Node (lymfeknute) og Metastase klassifikasjon = TNM- klassifisering (Tabell 1 og 2).

Denne klassifiseringen tar utgangspunkt i tumorens størrelse i cm, klinisk lymfeknutestatus (er der spredning til lymfeknuter) og metastaser til fjernorganer. Denne stadieinndelingen er til hjelp for å avgjøre om brystkreften primært skal behandles ved hjelp av kirurgi, og hvilken annen tilleggsbehandling kvinnen skal ha, for eksempel kjemoterapi, strålebehandling eller hormon behandling. Tumorer i stadium 1 (T1-N0M0) og stadium 2 (T0-2N1M0) er primært operable.

Stadium 2 (T3N0M0), stadium 3 (T0-2N2M0, T3N1-2M0, T4N0-2M0 og T0-4N3M0) og stadium 4 (T1-4N0-3M1)- tumorer er såkalte inoperable tumorer. I dette begrepet legges lokalavansert brystkreft hvor neoadjuvant behandling er aktuelt. Med neoadjuvant behandling forstås at kjemoterapi gis som primærbehandling, dvs før lokal behandling som kirurgi og/eller strålebehandling (2).

I 1995 hadde 60 % av kvinnene med brystkreft på tidspunktet for diagnosen, påvisbar sykdom kun i selve brystet, d.v.s. sykdom uten metastaser til lymfeknuter eller fjernmetastaser. I 1970 var dette tallet noe under 50 %. I forbindelse med innføring av mammografiscreening kan man forvente en økt påvisning av lokaliserte tumorer uten metastaser (Stadium 1=T1N0M0). Over tid har man imidlertid sett at andelen av kvinner med brystkreftsykdom i stadium 4 har vært konstant, d.v.s. tumorer i størrelseorden mindre enn 2 cm med flere lymfeknutemetastaser og påviste fjernmetastaser (T1-4N0-3M1). Det ser ut til at den observerte insidensøkningen de senere år utgjøres av kvinner med lokaliserte tumorer uten lymfeknutemetastaser og fjernmetastaser (Stadium 1= T1-N0-M0) (2).

Tabell1; TNM-klassifikasjon (American Joint Committee on Cancer=AJCC 2002 = UICC 2002)

Primærtumor (T)	
TX	Klassifikasjon ikke mulig pga manglende informasjon
T0	Ingen erkjent primærtumor
Tis	Carinoma in situ
Tis (DCIS)	Ductalt carcinoma in situ
Tis (LCIS)	Lobulært carcinoma in situ
Tis (Paget)	Paget's sykdom uten primærtumor. Pagets sykdom med primærtumor klassifiseres i henhold til størrelsen på primærtumor
T1	Tumor ≤ 2 cm i største diameter
T1mic	Tumor ≤ 0.1 cm i største diameter
T1a	Tumor $> 0.1 \leq 0.5$ cm i største diameter
T1b	Tumor $> 0.5 \leq 1.0$ cm i største diameter
T1c	Tumor $> 1.0 \leq 2.0$ cm i største diameter
T2	Tumor $> 2.0 \leq 5.0$ cm i største diameter
T3	Tumor > 5.0 i største diameter
T4	Tumor uavhengig av størrelse, men med direkte innvekst i hud eller brystvegg
T4a	Innvekst til brystvegg (ribben, intercostalmuskulatur, serratus anterior)
T4b	Med ødem, infiltrasjon eller ulcerasjon av huden på brystet inkludert peau d'orange eller satellitt hudtumores til samme bryst
T4c	Både T4a og T4b
T4d	Inflammatorisk carcinom

Klinisk lymfeknutestatus (N)	
NX	N-klassifikasjon ikke mulig på grunn av manglende informasjon
N0	Ingen påvisbare regionale lymfeknutemetastaser
N1	Bevegelige ipsilaterale axillære lymfeknutemetastaser
N2	Ipsilaterale aksillære lymfeknutemetastaser fiksert til hverandre eller andre strukturer, eller klinisk eller røntgenologisk påvisbare metastaser til ipsilaterale mammae interna lymfeknuter i fravær av klinisk påvisbare aksillære lymfeknutemetastaser
N2a	Ipsilaterale aksillære lymfeknutemetastaser fiksert til hverandre eller andre strukturer
N2b	Klinisk eller røntgenologisk påvisbare metastaser til ipsilaterale mammae interna lymfeknuter i fravær av klinisk påvisbare aksillære lymfeknutemetastaser

N3	Ipsilateral spredning til infraclaviculære lymfeknuter, eller spredning til klinisk eller røntgenologisk påvisbare ipsilaterale mammae interna lymfeknuter og samtidig klinisk påvisbare axillære lymfeknutemetastaser; eller ipsilateral spredning til supraclaviculære lymfeknuter med eller uten axillære eller mammae interna lymfeknutemetastaser
N3a	Klinisk påvisbare ipsilaterale infraclaviculære lymfeknutemetastaser og aksillære lymfeknutemetastaser
N3b	Klinisk eller røntgenologisk påvisbare ipsilaterale mammae interna lymfeknuter og samtidig klinisk påvisbare aksillære lymfeknutemetastaser
N3c	Klinisk påvisbare ipsilaterale supraclaviculære lymfeknutemetastaser

Fjernspredning (M)	
MX	M-klassifisering ikke mulig pga manglende informasjon.
M0	Ingen fjernspredning påvist.
M1	Fjernspredning påvist.

Tabell2: Stadielinndeling basert på TNM-klassifisering. (Fra Norsk Bryst Cancer Gruppens nettsider.) (NBCG.net)

Primært operabel brystkreftsykdom	
Stadium I	T1N0M0
Stadium II	T0-2N1M0 T2N0M0

Primært inoperabel brystkreftsykdom	
Stadium II	T3N0M0
Stadium III	T0-2N2M0 T3N1-2M0 T4N0-2M0 T0-4N3M0
Stadium IV	T1-4N0-3M1

1.3. Histopatologisk diagnose, prognose og behandling av brystkreft

70- 80 % av invasive karsinomer i brystet er histologisk av infiltrerende duktal type. 10-20% er av infiltrerende lobulær type, mens ulike andre typer utgjør resten (2). Invasiv brystkreft kan spres både lymfogen og hematogen. Tidlig diagnostikk og behandling, reduserer risikoen for spredning både lymfogen og hematogen (2).

De viktigste etablerte prognostiske faktorer i dag er tilstedeværelse og omfang av aksillære lymfeknutemetastaser, tumorstørrelse og histologisk gradering og tilstedeværelse av østrogen- og progesteron reseptorer. Dette er faktorer som avgjør om pasienten skal tilbys adjuvant behandling. Med adjuvant behandling forstås kjemoterapi og hormonterapi.

I dag er metastaser til aksillære lymfeknuter den mest etablerte prognostiske faktor for brystkreft. Pasienter med lymfeknutepositiv sykdom anses som høyrisikogruppe for senere utvikling av systemresidiv. Disse pasientene skal derfor ha adjuvant behandling etter bestemte retningslinjer.

Immunhistokjemisk bestemmelse av østrogen- og progesteronreseptor gjøres på alle invasive karsinomer. Hormonreseptorer i et tumorvev innebærer økt sannsynlighet for respons på hormonell påvirkning. Medikamenter som anti-østrogen (tamoxifen (TAM)) og aromatase-inhibitorer/inaktivatorer (Taxotere=aromataseinhibitor), har vist å ha en klar anti-tumoreffekt i behandling, og anbefales til kvinner operert for brystkreft tumor som er reseptor positive, og der primærtumor er over en viss størrelse og/eller det påvises metastaser til aksille.

Det gjøres også immunhistokjemisk bestemmelse av tilstedeværelsen av reseptoren for human epidermal growth faktor reseptor (HER 2) også kalt c-ers B2 eller c-neu. De kvinner som får påvist tilstedeværelse av denne reseptoren, tilbys Herceptin behandling, som består av anti-HER2 monoklonalt antistoff. Brystkrefttumorer som uttrykker c-erb B2 er svært sensitive for små mengder av vekst faktorer som gir signal til uhemmet proliferasjon av kreftcellene. Et høyt nivå av c-erb B2 protein på brystkreftcellene innebærer dårligere

prognose (3).

1.4. Brystkreft og overlevelse

Det dør ca. 750 kvinner i Norge hvert år av brystkreft. Brystkreft er den viktigste årsak til tapte leveår hos kvinner, mer enn både hjerte/kar sykdom og ulykker. Prognosen ved brystkreft er sterkt avhengig av stadium på diagnosetidspunkt. Fem års relativ overlevelse i Stadium I er 90.2 %, mot 17.0 % i Stadium IV. Brystkreftpasienter har en klar overdødelighet i mer enn 20 år etter at diagnosen er stillet (1).

1.5. Brystkreft og mikrometastatisk sykdom

Hos pasienter med brystkreftsykdom, vil det kunne påvises sirkulerende brystkreftceller i ulike stadier av sykdommen. Selv noen av kvinnene med brystkreftsykdom med små lokaliserte tumorer uten lymfeknutemetastaser i axillen, vil oppleve recidiv flere år etter initiell kirurgi og adjuvant behandling (3). Årsak til recidivet kan være at tumorceller unnslipper lokal og adjuvant behandling, og spres rundt i kroppen via blod eller lymfesystemet med preferanse for visse typer vev (lunge, skjelett og lever). Både kreftcellene og faktorer i vevet er med på å forklare denne organspesifisiteteten (5,6). Den metastatiske spredningen av celler fra en solid krefttumor foregår i flere trinn hvor hvert enkelt steg må lykkes for at en klinisk metastasering kan skje. Primærtumoren er avhengig av at det utvikles nye blodårer som kan tilføre næring til svulsten. Dette kalles angiogenese. Blodårene som dannes, er skjøre og ustabile, og kan være port for kreftceller fra hovedtumor og ut i kroppens egne blodårer (intravasering). Tumorceller kan også spres indirekte via det lymfatiske systemet ut i den store blodsirkulasjonen, og deretter bli ført til spesifikke organer via blodstrømmen. Kreftcellene har sannsynligvis ikke spesielle 'homing receptors' som gjør at de stanser i vev med spesielle ligander, men vil ende opp i spesielle organer utfra blodstrømmen, og mekaniske forhold som diameter på kapillærene. Kapillærer har en diameter på rundt 3-8 μm , røde blodceller har en diameter på 7 μm mens kreftceller generelt er mye større, 20 μm eller mer (6). En stor andel av kreftcellene spres via

blodbanen og ekstravaserer deretter til sekundær organer. Den hematogene spredningen og ekstravaseringen hevdes å skje med høy grad av effektivitet. Museforsøk har vist at opptil 83 % av injiserte melanom celler i blodbanen gjenfinnes i lever tre dager etter injeksjonen. Men i det samme forsøket, fant man at bare 2 % av kreftcellene hadde dannet mikrometastaser. Den videre prosessen med vekst i sekundærorganet er hevdet å være mindre effektiv. Dette fordi bare et fåtall av cellene som har ekstravasert, har klonogen kapasitet, og evner å stimulere angiogenese slik at det dannes mikroskopiske metastaser. Av de mikroskopiske metastasene har kun et fåtall av dem evnen til å danne raskt voksende makroskopiske metastaser. Dette har sammenheng med molekylære interaksjoner mellom cancerceller og celler i sekundærorganet (6).

Man vet altså at metastaser hos kvinner med brystkreft kan forekomme mange år etter den initielle behandlingen. En mulig forklaring på dette kan være at preangiogene ikke-vaskulariserte mikrometastaser gjennom en balansert tilstand av celledeling og apoptose, kan forbli hvilende i mange år, men når de får signal som gjør at vaskulariseringen kan starte, kan danne makroskopiske metastaser. En annen forklaringsmodell går ut på at ekstravaserte kreftceller ikke starter celledeling, men forblir hvilende (G 0 fase) i sekundær organet, men beholder sin evne til tumorvekst. Ved endring i cellenes mikromiljø, kan de starte og dele seg (6).

Enkelte hevder at det finnes en tumor stamcelle som er opphavet til kreftceller, og med bakgrunn i dette, jobber forskningsgrupper med å finne ut om det også kan være en bryst epitelial stamcelle. En bryststamcelle kan tenkes å være ansvarlig for den normal vevsfornyelse som skjer til enhver tid i et bryst i tillegg til den massive veksten som skjer av epitelialt brystvev i løpet av et svangerskap. Det kan også tenkes at en bryststamcelle er opphavet til brystkreftceller (7). Stamceller deler seg for selvfornyelse og for å generere celler som differensierer til modne lumbale og myoepiteliale celler. Mutasjoner i stamceller med påfølgende proliferasjon resulterer i en videreføring av mutasjonen, og

mutasjonen blir dermed generert videre til de differensierte cellene. Dersom differensierte celler fjernes langsomt (langsom "clearance" tid) eller den opprinnelige mutasjonen berører DNA stabilitet eller replikasjonsegenskaper, vil det etterhvert være store mengder av muterte celler som kan være utsatt for sekundære mutasjoner. En økende mengde med brystceller med flere mutasjoner, øker igjen sannsynligheten for ytterligere mutasjoner, og kan ende opp i klinisk påvisbar brystkreft sykdom (7). Sirkulerende brystkreftceller representerer mikrometastatisk sykdom.

1.6. Mikrometastatisk sykdom og prognose

Nyere kliniske studier har beskrevet at påvisning av isolerte brystkreftceller i beinmarg er en uavhengig prognostisk faktor som predikerer recidiv av sykdommen og negativt utfall med hensyn til overlevelse (9,10). Prinsippene for påvisning av sirkulerende brystkreftceller er stort sett de samme for både beinmarg og blod. Man kan derfor dele inn teknikkene for identifisering av sirkulerende tumorceller i henholdsvis immuncyto-/histokjemiske og nukleinsyre baserte teknikker.

De fleste metodene for påvisning av brystkreftcellene i beinmarg er basert på separasjon av beinmarg med hensikt å isolere mononukleære celler, deretter positiv seleksjon av brystkreftceller med antistoff og magnetiske kuler og til slutt farging av cellene med monoklonale epitelspesifikke antistoffer (11). Ved bruk av immuncyto-/histokjemiske teknikker tas det altså i bruk monoklonale antistoffer som er rettet mot tumorassosierte cellulære overflateantigener/proteiner for å identifisere og karakterisere enkelt tumorceller. Ulempene ved metoden har vært at den er vanskelig å standardisere, og at den er arbeidskrevende (12,13). Det har også vist seg at metoden kan gi falsk positive resultater i forbindelse med at de monoklonale antistoffene kan kryss reagere eller at tumorantigenene uttrykkes på kroppens egne normale celler. Det har vært beskrevet at immuncytokjemi kan påvise en kreftcelle i en bakgrunn på 10^5 - 10^6 normal beinmargsceller eller perifere blodceller (13). Noen grupper har benyttet seg av nukleinsyre baserte teknikker i beinmarg,

dvs PCR teknologi. Ikeda et. al beskriver at funn av mikrometastatisk sykdom i beinmargsprøver ved bruk av revers transkriptase PCR (RT-PCR) teknikk for CK 19, er en signifikant risikofaktor for recidiv av brystkreft uavhengig av aksillære lymfeknute metastaser (14). Slade et. al benyttet seg av en kompetitiv RT-PCR teknikk for påvisning av CK19 i beinmarg, og fant at PCR var en mer sensitiv teknikk sammenlignet med immunhistokjemiske teknikker (15).

Beinmargsaspirasjon medfører ubehag for pasienten, og er en mer tidkrevende prosedyre som må forgå i sykehus, sammenlignet med blodprøvetagning i en perifer vene, som kan gjøres på primærlegekontor.

Prognostisk betydning av sirkulerende celler i blod, er idag ikke like etablert som uavhengig prognostisk faktor som påvisning av brystkreftceller i beinmarg. Muller og Pantel hevder i tidsskriftet "Breast Cancer Research" i 2004 at blodbanen bare er et midlertidig oppholdssted for sirkulerende kreftceller, og at det ikke er kjent hvor stor andel av de sirkulerende kreftcellene som overlever og deres potensiale til å danne kliniske metastaser. En del av de sirkulerende kreftcellene går i apoptose hevder de samme forfatterne (16). Artikler av Stathopoulou et. al og av Weigelt et. al beskriver imidlertid at påvisning av sirkulerende brystkreftceller i blod før pasienten får adjuvant behandling er assosiert med økt risiko for recidiv og kortere overlevelse (17,18). Christofanilli et. al viser at antallet av sirkulerende celler før behandling av metastatisk brystkreftsykdom, er en uavhengig prediktor av sykdomsprogresjon og generell overlevelse (19).

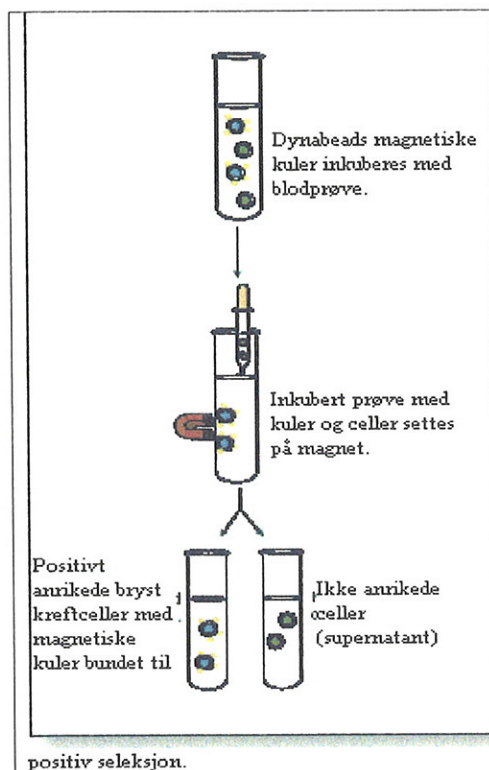
1.7. Anrikningsprosedyre

Antallet sirkulerende brystkreftceller kan være svært lavt, mindre enn 10 celler/mL blod, og man har funnet at ved å anrike målcellene kan man øke sensitiviteten på metodene for deteksjon av sirkulerende brystkreftceller (8). Det finnes anrikningsmetoder som benytter både positiv seleksjon av brystkreftceller og negativ seleksjon av ikke-målceller. Negativ seleksjon innebærer at man fjerner mest mulig av normale hematologiske celler uten å tape

kreftceller, mens det ved positiv seleksjon anrikes cancerceller fra størsteparten av normale blod- eller beinmargsceller.

Felles for de fleste anrikningsmetoder, er at de baserer seg på monoklonale antistoffer spesifikke for enten epitoper på brystkreftceller eller altså monoklonale antistoffer rettet mot spesifikke epitoper på leukocytter, for eksempel CD 45. Antistoffene binder seg til målcellene med høy affinitet. Antistoffene er festet via sin Fc-del til magnetiske kuler og gjør at cellene kan selekteres ved hjelp av en magnet (Figur 3).

Ved hjelp av positiv seleksjon kan man anrike brystkreftcellene fra den store normalpopulasjonen av hvite og røde blodceller. Dette vil kunne øke sensitiviteten på PCR analysen. Brystkreftceller er av epitelial opprinnelse, og dette benytter man seg ved anrikning av cellene. Epiteliale celler finnes til vanlig ikke i perifert blod, og dette er bakgrunnen for at man kan bruke antigene determinantene på disse cellene for anrikning. EpCAM (epitelial cell adhesion molecule) molekyler er epiteliale transmembrane glykoproteiner. EpCAM har intercellulær adhesjonsfunksjon som sannsynligvis har betydning for brystkreftcellenes evne til metastasering. Det er funnet at EpCAM kan ha hundre til tusen ganger forhøyet uttrykk i primær brystkreftsykdom og ved metastatisk sykdom (20). Flowcytometriske forsøk gjort ved avdelingen her, har imidlertid vist at ikke alle cellelinjer utgått fra brystkrefttumorer uttrykker EpCAM. Dette kan være tilfelle for brystkreftceller in vivo, og kan representere en feilkilde som i så fall vil gi falsk negative prøver (21).



Figur 3: Figuren viser prinsippet for positiv seleksjon. (modifisert illustrasjon fra Dynal PDF dok /nettside)

1.8. Real time PCR

Nukleinsyre teknikker baserer seg på påvisning av DNA eller RNA sekvenser som uttrykkes ulikt i tumorceller og øvrige blodceller og beinmargceller. For brystkreftceller gjelder at messenger ribonukleinsyre (mRNA) i cellene amplifiseres i en polymerase kjede reaksjon (PCR) etter først å ha blitt revers transkribert til komplementært deoksyribonukleinsyre (cDNA). Tradisjonell revers transkriptase polymerase kjede reaction (RT-PCR) har vært gjort på ulike mRNA transkripter, for eksempel CK 19, CK 18, CEA (carcioembryonic antigen), mammaglobin og telomerase. RT-PCR analyser har vært endepunktsanalyser hvor man har kjørt det amplifiserte produktet på for eksempel agarosegelelektroforese etter avsluttet PCR reaksjon. Sensitiviteten har vært oppgitt til en kreftcelle blant $10^6 - 10^7$ normale beinmargsceller eller blodceller (22). Man tenker seg at sensitiviteten er høyere i RT-PCR teknikker sammenliknet med immunhistokjemiske teknikker fordi man får

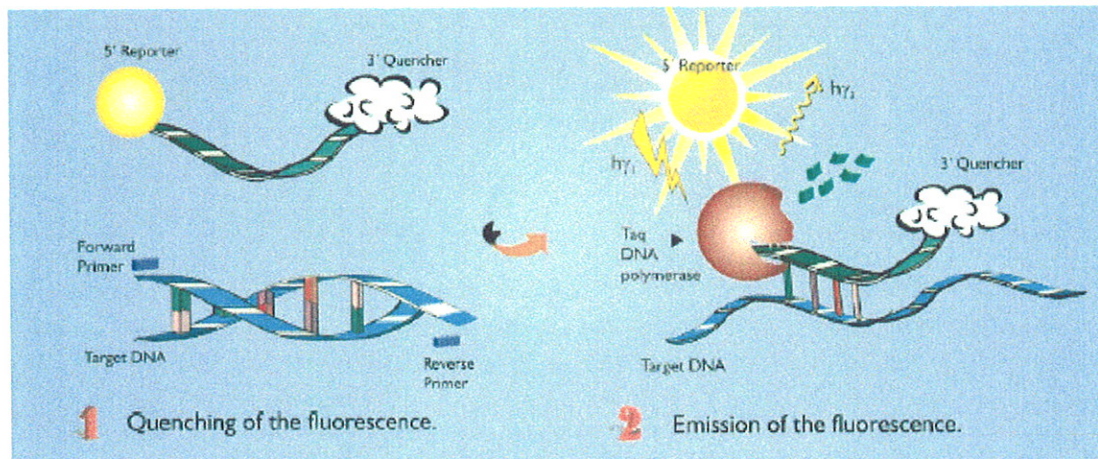
amplifisert eksponentielt små mengder av det opprinnelige mål mRNA. Tradisjonelle RT-PCR teknikker er imidlertid tidskrevende, og for å kunne kvantitere det endelige produktet, må man være sikker på at analysen termineres mens man fortsatt er i et lineært område med overskudd av reagenser. Det lineære område i tradisjonell RT-PCR har vært påvist gjennom empiriske forsøk enten ved å kjøre flere prøver med samme konsentrasjon av cDNA i forsøk med ulikt antall sykler eller ved amplifisering av ulike fortyninger av cDNA ved samme antall sykler. (23). Prinsippet for real time teknologi baserer seg på Taqman kjemi, og at det skjer en kvantitering av det aktuelle transkriptet i løpet av hver syklus underveis i PCR amplifikasjonen. Taqman polymerase enzymet som brukes i analysen, har i tillegg til den klassiske 5' - 3' polymerase-aktiviteten, også en 5'-exonuklease aktivitet. Dette innebærer at det i tillegg til spesifikke primere komplementære til transkriptet, må det designes en spesifikk probe som også må være komplementær til transkriptet (Figur 4). Den spesifikke proben har i sin 5'-merkede ende fått bundet til seg en fluorokrom, for eksempel 6-Carboxyfluorescein (6-FAM). Dette fluorokromet, også kalt reporter, emitterer fluorescerende lys av en bestemt bølgelengde. Til den 3'-merkede enden av proben er det bundet et såkalt quencher molekyl ("slokkemolekyl"), for eksempel 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA). Når både quencher og reporter er bundet til intakt probe, vil quencher molekylet slokke emisjonen av fluorescens lys fra reporter. Slokkingen gjelder så lenge reporter og quencher befinner seg i nærheten av hverandre. Proben må designes slik at den har en høyere smeltetemperatur (T_m) slik at den i annealingsfasen i PCR reaksjonen, er fullstendig hybridisert. I annealingsfasen, vil 5'-exonukleaseaktiviteten til TAQ-polymerasen tygge opp den hybridiserte proben slik at det fluorescerende reporter molekylet fjernes fra quencheren. Dette resulterer i at emisjonen av fluorescens av en viss bølgelengde fra reporter registreres i Abiprism maskinen, og man ser at for hver syklus øker fluorescensen (Figur 4 og figur 5). I PCR bufferen er det inkludert en passiv referanse farge ROX. Dette er en intern referanse kontroll som emittert fluorescens fra reporter

normaliseres til i løpet av dataanalysen. Normalisering av reporter er nødvendig for å korrigere for fluktuasjoner av fluorescens på grunn av konsentrasjons- eller volumforskjeller. Datasoftwaren kalkulerer normaliserte verdier ved å dividere emisjonsintensitet for reporter med emisjonsintensitet for passiv referanse farge. Dette gir en normalisert verdi for reporter (R_n) for en gitt prøve. R_{n+} verdien er R_n verdien til en reaksjon som inneholder alle komponenter inkludert templatet. R_{n-} verdien er R_n verdien til en nullprøve eller en prøve som ikke er amplifisert.

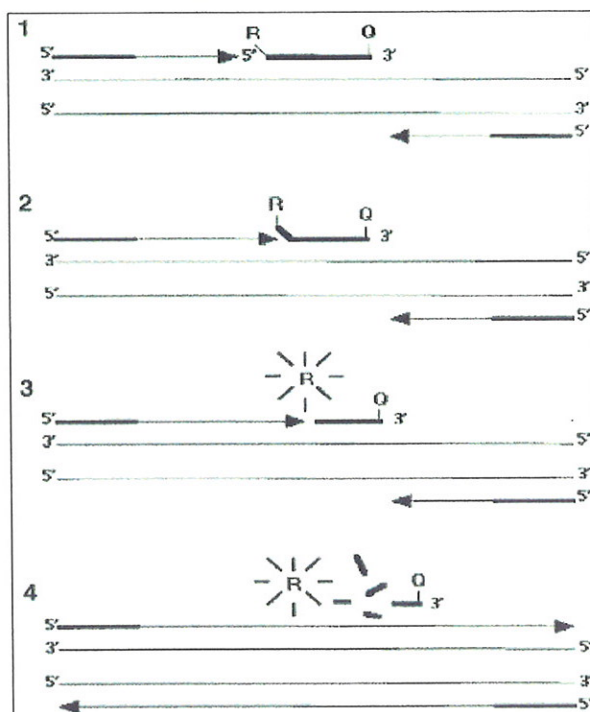
Delta ΔR_n er differansen mellom R_{n+} og R_{n-} , og er den verdien som forteller hvor stort fluorescenssignal som genereres for en prøve under gitte PCR betingelser (Figur 6).

Økningen i fluorescens aktivitet er proporsjonal med det akkumulerte amplifiserte PCR-produktet. Baseline defineres ut fra de første syklene (syklus 3 til 11) hvor det er mest bakgrunnsfluorescens, og foreløpig ikke eksponentiell økning av fluorescens i prøven. Den satte terskellinjen defineres av softwaren til å være 10 standardavvik fra midlere baseline fluorescens verdi. Cycle threshold defineres som den syklusen der en prøves delta R_n verdi krysser terskellinjen. Kvantitering baserer seg altså på terskelsyklus (cycle threshold = C_t) og måles i løpet av eksponentiell fase av PCR reaksjonen hvor alle PCR reagenser er i overskudd. C_t -verdien representerer en deteksjonsterskel, og er den syklusen hvor emittert fluorescens fra reporterfluorokromet øker over bakgrunnsfluorescens (Figur 7).

Terskelverdien er omvendt proporsjonal med antallet av måltemplat; desto høyere templat konsentrasjonen var i utgangspunktet, desto lavere er terskelverdien som kan måles i løpet av amplifikasjonen. Dersom man har fem prøver med kjente konsentrasjoner og deres tilhørende C_t -verdier, kan man lage en standardkurve som kan brukes til å bestemme konsentrasjonen av templat i en ukjent prøve (Figur 8).



Figur 4: Illustrasjon av reporter-quencher system i real time PCR.



Figur 5: Fluorogen 5'-exonuklease kjemi.

(1): Etter hybridisering av 5'-primer og 3'-primer, polymeriserer Taq-polymerasen som i en tradisjonell PCR reaksjon. Probe er også hybridisert, og reporter og quencher er så nær hverandre at reporterens fluorescens slokkes av quenchemolekylet.

(2) og (3): Polymerasen 5'-exonuklease aktivitet tygger opp hybridisert probe. Quencher og reporter kommer så langt fra hverandre at quencheren ikke lenger kan slokke emittert lys fra reporter.

(4): Emittert fluorescens detekteres av dataenhet i Abiprism maskinen.

(illustrasjon hentet fra <http://www.abrf.org/JBT/1999/March99/mar99grove.html>)

The following equation expresses the relationship of these terms:

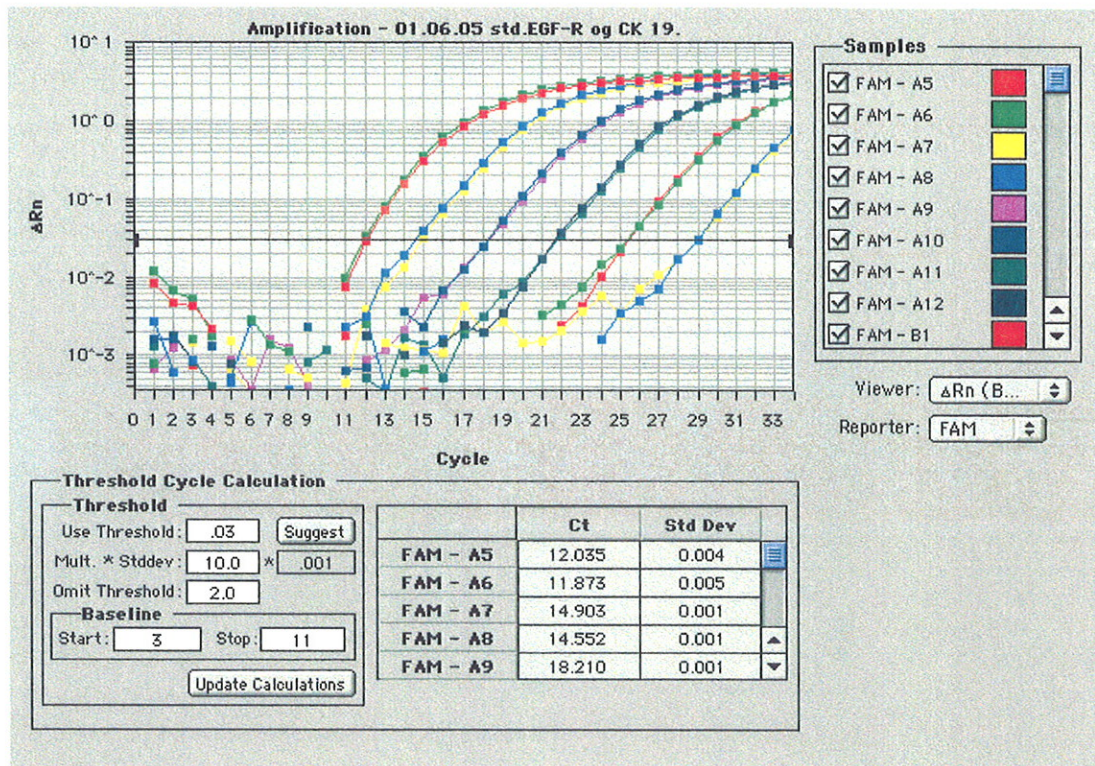
$$\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$$

where:

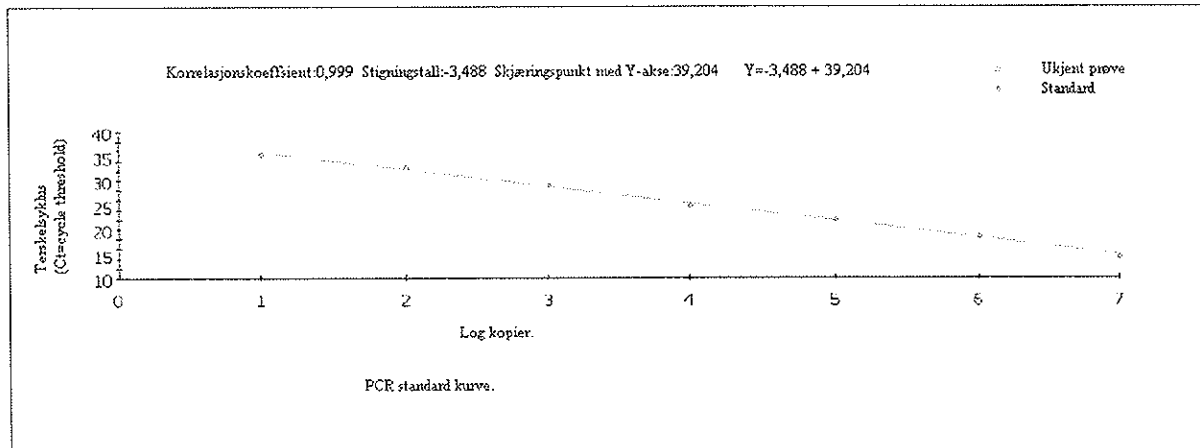
$$R_n^+ = \frac{\text{Emission Intensity of Reporter}}{\text{Emission Intensity of Passive Reference}} \quad \text{PCR with template}$$

$$R_n^- = \frac{\text{Emission Intensity of Reporter}}{\text{Emission Intensity of Passive Reference}} \quad \text{PCR without template or early cycles of a real-time reaction}$$

Figur 6: Likning for beregning av relativ fluorescens (ΔR_n) i real time PCR reaksjon (http://www.wi.mit.edu/CMT/protocols/TqMn_Univ_PCRMstrMx.pdf)



Figur 7: Eksempel på datautskrift fra Abiprism 7700 maskinen etter endt analyse. Utskriften viser mengden relativ fluorescens som blir emittert i løpet av PCR reaksjonen for ulike prøver. Den horisontale sorte linjen merket C_t representerer terskellinjen, og det er fra denne at C_t -verdien (C_t = Cycle threshold) for den enkelte prøve settes.



Figur 8: Eksempel på standardkurve som kan brukes til å beregne kopier i ukjent prøve ved hjelp av 5-6 standarder med kjente konsentrasjoner.
(Modifisert illustrasjon hentet fra <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>)

1.9. Gen markører

Cytokeratin 19 (CK19) er et intermediært filament (protein) som finnes i cytoplasma i epitelceller, og er en del av cellens cytoskjelett. CK19 uttrykkes ikke i lymfoide eller hematopoietiske celler (24,25).

Dette er bakgrunnen for at man har brukt CK 19 mRNA i RT-PCR teknikker som markør for tumorceller av epitelial opprinnelse i blodet. Falske positive resultater kan imidlertid forekomme, og kan skyldes amplifikasjon av illegitimt transkribert CK19 i normale hematologiske celler. Falske positive resultater kan også forekomme dersom det skjer amplifikasjon av såkalte CK-19 pseudogener som finnes på genomisk DNA, og/eller amplifikasjon av CK19 mRNA fra kontaminerende epitelceller fra hud (15). Med tanke på å unngå falske positive resultater i en PCR analyse, vil det blant annet være viktig å kaste de første ml blod/beinmarg, før selve prøven til analyse tas, for å unngå at epitelceller fra innstikket skal kontaminere prøven. Ved valg av primere er det viktig at disse legges til områder med størst mulig variabilitet for mRNA sekvensen til CK19 og DNA sekvens til pseudogener. Det er beskrevet at det finnes to pseudogener som har tilnærmet lik nukleotidsekvens som CK19 (26). Ved å bruke DNase enzymer ved RNA isolering, vil

restmengder DNA tygges opp, og det blir mindre fare for interferens av pseudogener. Illegitim transkripsjon, d.v.s. transkripsjon av gener som ikke har noen reell funksjon i hematologiske celler, kan ikke elimineres, men ved å introdusere en cut-off verdi, kan man skille mellom genuttrykk i friske celler og den økte transkripsjonen man finner i brystkreftceller.

Epidermal growth factor receptor (EGF-R) er et transmembrant protein på 185 kD, som uttrykkes i alle celler bortsett fra hematologiske celler (27).

EGF-R er hevdet å være overuttrykt i 50 - 70 % i tykktarmskreft, lungekreft og i brystkreft.(27,28). Overuttrykk av EGF-R gjør at reseptorene responderer på svært små mengder av veksthormoner, og responsen ved binding til EGF-R er at det sendes signaler til cellekjernen om uhemmet proliferasjon og differensiering.

Dette er bakgrunnen for valget av EGF-R og CK 19 som markører for brystkreftceller i vår PCR analyse.

For å ha kontroll på kvaliteten av RNA / cDNA, inkluderer man i PCR analysen såkalte housekeeping gener, dvs. påvisning av transkript som uttrykkes likt av alle kroppens celler og som ikke endrer uttrykk. Det finnes ulike housekeeping gener. Vi har benyttet oss av transkriptene for APRT og β_2M .

1.10. Formål

Formålet med studien er å utvikle en sensitiv og spesifikk metode for påvisning av sirkulerende brystkreftceller. Det knytter seg fortsatt usikkerhet til hva sirkulerende brystkreftceller betyr i forhold til metastasering og prognose, men det er derfor viktig å utvikle metoder for påvisning av disse cellene, for om mulig å avklare dette.

Vi ønsker å kombinere en positiv anrikningsprosedyre basert på monoklonale antistoffer bundet til magnetiske kuler rettet mot EpCAM på brystkreftcellene, og en real time PCR metode basert på påvisning av to ulike transkripter, EGF-R og CK19 som har forhøyet ekspresjon i en stor andel av brystkreftceller. En stor del av analyseresultatene som det refereres til her, er gjort på et tidspunkt i utviklingen av metoden hvor det kun var etablert primere og probe for CK 19 og APRT. Analysen har senere vært utviklet videre ved avdelingen, og inkluderer foruten markøren for CK 19 også EGF-R.

2. Materiale og metoder

2.1. Cellelinjer

Human brystkreftcellelinje MDA MB 468 har vært dyrket. Denne har ATCC (American Type Culture Collection) nr. HTB-132, og stammer opprinnelig fra adenocarcinom fra brystet til en kvinne. Cellelinjen vokser adherent i kultur, og morfologisk har cellene epitelialt utseende. Cellelinjen har vært dyrket i Leibowitz 15 kulturmedium med 2mM L-glutamine og 10% føtalt kalveserum. Dyrkningsbetingelser har vært ved 37 ° celsius i celleinkubator uten CO₂. Den andre cellelinjen som har vært dyrket er Zr-75-1 med ATCC nr. CRL-1500 og kommer fra ductalt carcinom fra bryst til kvinne. Cellelinjen vokser adherent i kultur, og morfologisk har cellene et epitelialt utseende. Cellelinjen har vært dyrket i RPMI 1640 med 2mM L-glutamine, 1,5 g/L Natrium Bikarbonat, 4,5g/L glukose, 10mM HEPES, 1mM Natrium Pyruvat (90 %) og 10 % føtalt kalveserum. Dyrkningsbetingelser har vært ved 37 ° C i celleinkubator med CO₂. Cellelinjene har vært brukt til spiking av blodprøver fra friske blodgivere givere for å vurdere sensitivitet og spesifisitet av analysen.

2.1.1 Dyrkning av celler

Kulturene har vært splittet ved konfluerende vekst. Vekstmedium fjernes og cellene vaskes med ca. 3 ml 10mM EDTA med 0,1 % DEPC. Ytterligere 3 ml vaskebuffer blir tilført og cellene inkuberes ved 37 ° C. Man inspiserer visuelt om cellene har løsnet. Dersom cellene ikke er fullstendig løsnet, kan man banke forsiktig på cellekulturflaske for å løsne cellene. Når alle cellene har løsnet, tilsettes 10 ml oppvarmet kulturmedium. Cellene overføres til et sentrifugerør og sentrifugeres ved 1100 rpm i 5 minutter. Supernatanten fjernes og cellene resuspendes i ca. 5 ml oppvarmet vekstmedium. Et passende volum av cellene overføres til en ny cellekulturflaske som inneholder ca.10 ml cellekulturmedium.

2.1.2.Nedfrysing av celler

Etter splitting av celler, tilsettes DMSO dråpevis til den har en konsentrasjon på ca. 5 % av

den totale celledensitasjon. Celledensiteten bør være rundt $10^6 - 10^7$ celler/ml. Etter tilsetning av DMSO, overføres 1 ml av denne celledensitasjon til et cryorør og plasseres i en isoporeske i -70°C over natt. Deretter kan de overføres til lagring ved -190°C i gassfasen av flytende nitrogen..

2.1.3. Tining av celler

Cryorør tas opp fra nitrogen-tanken og celledensitasjonen tines ved å dyppe cryorøret raskt i et 37°C vannbad. Før cellene tas inni sterilbenken, vaskes rørets utside med 70 % etanol. Innholdet i røret overføres til et 15 ml sentrifugerør, og 10 ml oppvarmet vekstmedium tilsettes forsiktig ved å at det appliseres dråpevis. Cellene sentrifugeres deretter ved 1100 rpm i 5 minutter. Supernatanten fjernes og cellene resuspenderes i 5 ml nytt oppvarmet vekstmedium. De kan deretter tilsettes en kulturflaske som inneholder 10 ml kulturmedium. Cellene dyrkes ved 37°C uten CO_2 .

2.1.4. Celledensitasjon

Passerer celledensitasjonen før telling i tellekammer gjennom en sprøytespiss/ nål flere ganger for å være sikker på at cellene ligger enkeltvis og ikke i klumper. Celledensitasjon gjøres i et KOVA tellekammer. Arbeidsløsning av Acridine orange består av 1 ml Acridine orange og 9 ml PBS. Cellene fortynnes til 90 μl celledensitasjon og 10 μl Acridine orange arbeidsløsning (Fortynningsfaktor; 10/9). Cellene telles under UV- lys i mikroskop. Tre store ruter i tre ulike kammer telles. Deretter kan celledensitasjonen beregnes:

$$[\text{celle konsentrasjon}] = \frac{9 \cdot \tilde{m}_{\text{celler}} \cdot DF}{V_{\text{grid}}} = \frac{9 \cdot \tilde{m}_{\text{celler}} \cdot \frac{10}{9}}{0,9\mu\text{l}} \quad \text{Volum av tellekammer (V}_{\text{grid}}\text{):}$$

0,9 μl

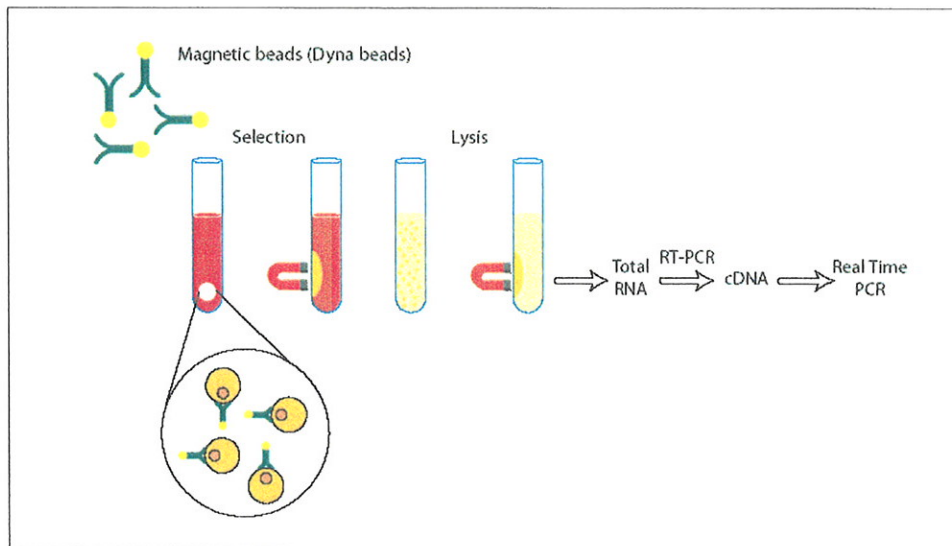
DF= dilution-factor = fortynningsfaktor.

2.2. Blodprøver

Blodprøver fra blodgivere har vært brukt til spiking eksperimenter. Blodgivere har på forhånd blitt forespurt og akseptert å gi mindre mengder blod til forskningsformål. For å unngå kontaminering med epitelceller ved venepunksjon, blir de første 4-5 ml med EDTA blod kastet. Det tas deretter 3 prøver a 7 ml EDTA blod hvorfra det deretter overføres til sammen 15 ml i et 50 ml sentrifugerør. Det skal også analyseres 12 blodprøver fra kvinner

med metastatisk brystkreftsykdom. Studien er anbefalt av etisk komité i region V.

Se figur 5 for oversikt over prosedyren.



Figur 5:En oversikt over analysen med de ulike trinnene.

2.3. Isolering av mononukleære celler (MNC)

4 ml blod fortynnes i 4 ml PBS 0,3 % EDTA 0,1% DEPC buffer. Fortynnet blodprøve overføres deretter forsiktig til 4 ml LymphoPrep (Axix-Shield PoC) i et 15 ml sentrifuge rør. Prøven sentrifugeres i 30 minutter ved 1100 rpm. De mononukleære cellene overføres deretter til et nytt rør hvor det tilsettes 10 ml buffer. Prøvene sentrifugeres ved 2000 rpm i 5 minutter., Supernatanten fjernes og cellene resuspenderes I 1-2 ml buffer. De mononukleære cellene telles på Sysmex celledeteller.

2.4. Anrikingsprosedyre

Anrikingsprosedyren baserer seg på positiv seleksjon av epiteliale celler. De magnetiske kulene som benyttes til anrikning kjøpes fra Dynal og kalles Dynabeads epithelial enrich (produkt nr.161.01-02). Tumorcellene anrikes fra fullblod. De magnetiske kulene er dekket med monoklonalt IgG₁ antistoff (mAb Ber Ep4) fra mus spesifikt for to glykopeptid

membran antigener (34 og 39 kDa) som uttrykkes på fleste normale og neoplastiske humane epiteliale celler.

De magnetiske kulene må vaskes i 1-2 ml av vaskebuffer før de tilsettes blodprøven, for å fjerne preservativer som kan være toksiske for cellene. Kulene settes på magnet etter tilsetting av vaskebuffer og supernatanten fjernes. Kulene resuspenderes i originalt volum. Tumorcellene anrikes fra 15 ml EDTA blod ved hjelp av 375 µl magnetiske kuler ($1 \cdot 10^7$ kuler per ml blod). Kuler og blodprøver inkuberes i 30 minutter på en roller coaster ved 4 °C. Etter denne inkuberingen, jobber man videre på is. Etter roller coaster, plasseres prøveglassene på en magnet (Dynal MPC prod.nr.120.24) i 8 minutter (etter 4 minutter snus magneten med prøve i forsiktig opp/ ned en gang). Etter dette, dekanteres supernatanten av prøveglasset mens prøven står i magneten. Prøven med kuler resuspenderes forsiktig med 4-5 ml av en PBS vaskebuffer tilsatt 0,1 % BSA og 0,6 % Natrium Citrat. Prøven settes deretter på magnet igjen for nye 5 minutter. Magnet med prøve på vendes forsiktig etter halvgått tid, dvs. 2 1/2 minutt. Supernatanten helles forsiktig av og evt. bunnfall suges forsiktig av ved hjelp av en pipette. Prøven kan deretter tas av magneten og resuspenderes i ca.1 ml vaskebuffer. Prøven overføres til et eppendorfrør. Cellene er nå klar til RNA isolering.

Modifisert metode med ammoniumklorid lyseringsvæske

Etter at prøvene hadde stått 8 minutter på MPC, ble supernatanten fjernet. Det ble tilsatt 3-4 ml vaskeløsning, og prøven står på magnet i 2 minutter. Supernatanten fjernes på nytt og cellene og kuler resuspenderes i ca 1 ml vaskebuffer. Tilsetter ammoniumkloridløsning i forholdet 1:5 og lar prøven stå på magnet i 5 minutter. Heller av supernatant. Vasker med 3-4 ml vaskebuffer. Lar prøven stå på magnet i 2 minutter. Heller av supernatanten og pipetterer av evt bunnfall. Cellene og kulene resuspenderes i 800 µl vaskebuffer.

2.5. Total RNA isolering

Totalt RNA ble ekstrahert fra celler ved hjelp av et kommersielt tilgjengelig RNA isolasjonskit (Qiagen Rneasy mini kit) i henhold til oppgitte spesifikasjoner fra leverandør. Cellene sentrifugeres i eppendorfsentrifuge ved 9000 rpm. i 2 minutter. Supernatanten fjernes forsiktig. Eppendorfrøret tilsettes 350 µl RLT buffer med β-Mercaptoethanol (lyseringsbuffer). Prøver mikses deretter på vortex mikser og homogeniseres i minst 30 sekunder. Etter dette settes den lyserte prøven på en liten MPC (magnetic particle concentrator) i 3 minutter. Man overfører så supernatanten til et nytt eppendorfrør og jobber videre med denne. Man tilsetter 350 µl 70 % ethanol til eppendorfrør, og blander prøven og etanol godt ved å pipettere opp og ned flere ganger. Prøven overføres deretter til en RNeasy kolonne og sentrifugeres i Eppendorf-sentrifuge ved 13000 rpm i 15 sekunder. Fjerner bunnfall/væske. Tilsetter 350 µl RW1-buffer, sentrifuger prøvene på nytt ved 13000 rpm i 15 sekunder. Heller av bunnfall/væske.

80 µl DNase (10 µl DNase og 70 µl Buffer RDD, Qiagen) tilsettes direkte på membranen i kolonnen. Kolonnen skal nå stå og inkubere i 15 minutter ved romtemperatur. Etter 15 minutter tilsettes ytterligere 350 µl RW1-buffer, og kolonnene sentrifugeres ved 15000 rpm i 15 sekunder. RNeasy kolonnen overføres så til et nytt samlerør. Kolonnen vaskes så 2 ganger med 500 µl RPE vaskebuffer, og sentrifugeres ved 13000 rpm i henholdsvis 15 sekunder og 2 minutter. All bunnfall/væske fjernes og kolonnene sentrifugeres i 1 minutt ved 13000 rpm. Deretter plasseres kolonnene i nye eppendorfrør, og det tilsettes 27,5 µl RNase fritt vann direkte på kolonnemembranen. Inkuberer kolonnen i romtemperatur i 1 minutt. Prøvene sentrifugers ved 13000 rpm i 1 minutt.

2.6. cDNA syntese

Det eluerte RNA materialet (se punkt 2.2.) blir brukt i den videre cDNA- prosedyre. Det ble ikke gjort spektrofotometriske målinger av det isolerte RNA-prøvemateriale, ettersom prøvematerialet inneholder så lite RNA at spektrofotometriske målemetoder (som var

tilgjengelig i laboratoriet) ikke er sensitive nok. Alt isolert RNA, ca. 26,5 µl overføres til et 0,2 ml rør. Til 26,5 µl RNA tilsettes 2,5 µl Primer Poly T (8 pmol/µl) og 2,5 µl dNTP (10mM). Prøvene inkuberes deretter ved 65 ° C i 5 minutter. Prøvene skal deretter avkjøles raskt på is. Etter dette tilsettes 5 µl DTT (100mM Dithiothreitol), 10 µl 5x First strand buffer og 1 µl av rekombinant Ribonuclease inhibitor (40 U/µl). Prøven sentrifugers raskt opp til 1000 rpm for deretter å inkubere ved 42 grader i 2 minutter. Deretter tilsetter man 2,5 µl av SuperscriptII Reverse Transcriptase (200 U/µl). Prøvene sentrifugeres raskt opp til 1000 rpm hvorpå de inkuberes i 42 ° C i 50 minutter og ved 70 ° C i 15 minutter. Dette gir totalt reaksjonsvolum på 50 µl og er optimalt for 1 µg totalt RNA. Alle inkuberingstrinnene er forprogrammert i et program i Perkin Elmer thermale cyclers.

2.7. Real time PCR

Primere og prober for CK 19 har blitt designet med tanke på å unngå falske positive signaler fra pseudogener på DNA, og er derfor lagt slik at 5`-primer krysser en exon/intron grense. Til design av primere og prober for EGF-R og B2-microglobulin, har vi benyttet oss av Primer express, som er et program tilknyttet til Abiprism 7700 maskinen for optimal design av primere og probe til real time analyser. Probene har i sin 5`-ende 6-FAM og i 3`-ende TAMRA fluorochromer, hhv. reporter og quencher (MedProbe). På analyseoppsettet inkluderes alltid minst to vann kontroller = no template control (NTC).

Primere og probe sekvenser for alle transkriptene er vist i tabell 3. Optimale primer og probekonsentrasjoner er bestemt etter optimaliseringsforsøk hvor ulike konsentrasjoner er prøvd ut mot det samme templat. Se tabell 4 for optimale konsentrasjoner av primere og probe.

Real time PCR analysen utføres på is, og prøvene pipettes i optiske PCR brett med optiske lokk. Mastermix-løsning for de ulike transkriptene inneholder et totalvolum på 25 µl bestående av hhv. 2,5 µl 25mM MgCl₂, 2,5 µl 10xTMBA-buffer, 0,5 µl 10mM nukleotider

dATP, dGTP og dCTP, 0,5 µl 20mM dUTP, 1,25 µl 1 % gelatin, 2,5 µl av alle primere og prober, 6,75 µl av destillert vann, 0,25 µl av 5 U/µl Amplitaq Gold DNA polymerase, 0,25 µl av 1U/µl AmpErase U og 2,5 µl av cDNA. Etter tilsetning av mastermix og prøvemateriale til brønnene, blir de lukket og satt i Abiprism 7700 maskinen hvor følgende syklus tider i sekunder og temperaturer er lagt inn: 2 minutter ved 50 ° C, 10 minutter ved 95 ° C, 6 sykluser bestående av 15 sekunder denaturering ved 95 ° C og 1 minutt annealing/extension ved 60 ° C. Deretter 40 sykluser bestående av 15 sekunder denaturering ved 95 ° C og 1 minutt annealing/extension ved 56 ° C.

Tabell 3. Tabell med nukleotidsekvenser for primere og prober brukt i real time PCR.

<i>Primer/Probe</i>	<i>Sekvens</i>
CK19 5`- primer	5`-AAC-CAA-GTT-TGA-GAC-GGA-A-3`
CK19 3`- primer	5`-TGC-GCA-GGC-CGT-TGA-3`
CK19 probe	5`-CGG-CCT-CCA-CGC-TCA-TGC-3`
EGF-R 5`- primer	5`-GGG-TGC-AGG-AGA-GGA-GAA-CTG-3`
EGF-R 3`- primer	5`-GCG-CCC-GGA-GCA-CTG-3`
EGF-R probe	5`-CAG-AAA-CTG-ACC-AAA-ATC-ATC-TGT-GCC-3`
APRT 5`- primer	5`-AAC-CAT-GAA-CGC-TGC-CT-3`
APRT 3`- primer	5`-TCT-CCC-TGC-CCT-TAA-GC-3`
APRT probe	5`-CCA-CCA-GGC-TCA-CGAACT-CC-3`
B2-M 5`-primer	5`-TCC-AGC-GTA-CTC-CAA-AGA-TT-3`
B2-M 3`-primer	5`-GCA-ATT-CAG-GAA-ATT-TGA-CTT-T-3`
B2-M probe	5`-CAG-GTT-TAC-TCA-CGT-CAT-CCA-GC-3`

Tabell 4. Optimale primer og probekonsentrasjoner.

<i>Primer og probe :</i>	<i>Optimal konsentrasjon/nM</i>
CK19 5`- primer	5000
CK19 3`- primer	5000
CK19 probe	1000
EGF-R5`- primer	2000
EGF-R3`- primer	2000
EGF-R probe	1000
APRT5`- primer	2000
APRT3`- primer	2000
APRT probe	1000
B2-M 5`- primer	5000
B2-M 3`- primer	5000
B2-M probe	1000

3. Resultater

Metodeoptimalisering

3.1. Bruk av DNase for å unngå amplifikasjon av pseudogener

Bakgrunnen for forsøket er å finne ut om det er nødvendig med bruk av DNase i løpet av RNA isoleringsprosedyren, for evt. å fjerne kontaminerende DNA som man tenker seg kan uttrykke pseudogensekvenser svært like nukleotidsekvensen for cytokeratin 19.

Prøvematerialet består av hvite blodceller isolert fra blodgivere.

Tabell 5: Viser resultater for seks prøver bestående av cDNA (fra 1 µg totalt RNA) isolert fra $\sim 1 \cdot 10^7$ mononukleære celler fra blodprøve fra blodgivere.

Real time PCR CK 19, baseline 3-15, terskellinje, 0,01, $T_{ann.} = 60^\circ \text{C}$.

Prøveid.	C_t , CK 19, Dnase +	C_t , CK19, Dnase -
1	38,5	32,2
	39	33,9
2	40	32,1
	40	32,5
3	40	36,1
	40	37
4	40	36,2
	40	37
5	40	36
	40	36,5
6	38,5	36,7
	38,6	37

Forsøket viser at bruk av DNase i løpet av RNA-isoleringsprosedyren for alle de seks prøvene bestående av cDNA tillaget av 1 µg totalt RNA, gir en høyere C_t -verdi, dvs lavere konsentrasjon av transkriptet for CK 19 i alle seks prøver. Dette er i tråd med hva vi ønsker siden fravær eller eliminasjon av signaler fra hvite blodceller, vil gi en økt spesifisitet for analysen.

3.2. Optimalisering av primere og prober

Primer- og probeoptimalisering har vært utført ved å bruke det samme templat, og primere og prober har vært valgt utfra de konsentrasjoner som gir lavest C_t verdi og høyest ΔR_n .

Primeroptimalisering ble utført for CK 19 primere og probe og viste at den optimale konsentrasjonen for 5' og 3' primer var 500 nM for begge. Optimal probekonsentrasjon var 100 nM. Primeroptimalisering for EGF-R primere og probe viste at den optimale konsentrasjonen for 5' og 3' primer var 200 nM for begge. Optimal probekonsentrasjon var 100 nM. For APRT viste optimal konsentrasjon å være for hhv. 5' 200 nM og for 3' 200 nM. Optimal probekonsentrasjon var 100 nM. Optimalisering for β 2M viste for 5' og 3' primer at optimal konsentrasjon var 500 nM for begge. Optimal probekonsentrasjon var 100 nM (tabell 4).

3.3. Fjerning av leukocytter i forbindelse med anrikningsprosedyren

Den positive seleksjonen av brystkreftceller betyr en anrikning av denne celletypen og en fjerning av leukocytter. Leukocytter kan tenkes å bidra til illegetim transkripsjon av CK19. Effektiviteten av å fjerne leukocytter måles ved hjelp av celledtelling før anrikning i selve blodprøven og etter anrikning i første "waste". Forsøket gjøres ved å tilsette 10^4 Zr 75-1 celler til 4 blodprøver på 5 ml hver. Deretter gjøres anrikningsprosedyre etter protokoll i materiale/metode-kapittel.

Det gjøres celledtelling av antall hvite blodceller i blodprøvene før anrikningsprosedyre vha. Sysmex celledteller. Celledtelling av antallet hvite blodceller gjøres deretter av supernatanten som helles av den anrikede prøven på MPC etter 8 minutter.

Tabell 6: Viser antallet hvite blod celler før og etter anrikning.

Prøvenr:	WBC/ (celler/ μ l) før anrikning	Totalt antall WBC i 5000 μ l, Før anrikning i fullblodprøve	WBC/ (celler/ μ l) Etter anrikning	Totalt antall WBC i 5000 μ l, Etter anrikning i waste
1	$3,8 * 10^3$	$1,9 * 10^7$	$3,8 * 10^3$	$1,9 * 10^7$
2	$3,7 * 10^3$	$1,9 * 10^7$	$3,8 * 10^3$	$1,9 * 10^7$
3	$5,8 * 10^3$	$2,9 * 10^7$	$5,6 * 10^3$	$2,8 * 10^7$
4	$5,7 * 10^3$	$2,9 * 10^7$	$6,0 * 10^3$	$3,0 * 10^7$

Forsøket viser at for to prøver er celledtallet for hvite blodceller målt på Sysmex før og etter anrikning det samme. I en prøve har celledtallet økt etter anrikning fra 2,9 til $3,0 * 10^7$ celler.

I en annen prøve har celletallet falt fra 2,9 til $2,8 * 10^7$.

3.4. Beregning av kontaminerende WBC etter anrikning

To blodprøver fra normalt perifert blod på 5 ml hvor hver ble tilsatt 10^5 MDA MB 468 celler. I forsøket ble det i tillegg inkludert en blodprøve på 5 ml som ikke ble tilsatt kreftceller.

Prøvene ble behandlet i henhold til anrikningsprosedyre med hensyn til antall magnetiske kuler og andre betingelser. Etter anrikning og resuspending i 1 ml buffer tas det ut 90 μ l anriket prøvemateriale som tilsettes 10 μ l Acridin Orange. Dette blandes godt og man tilsetter blandingen til et tellekammer. Bruker formel under pkt 2.1.5 for beregning av cellekonsentrasjon.

Tabell 7: Viser antall hvite blodceller og MDA MB 468 celler som blir anriket i løpet av anrikningsprosedyren.

Prøveid.:	MDA MB 468, celletall i tellekammer (totalt antall celler i hele grid)	MDA MB 468, Etter anrikning. Celler/ μ l	Totalt antall MDA MB 468 celler i 1000 μ l etter anrikning
A	86	106	106000
B	140	173	173000
Prøveid.	WBC, celletall i tellekammer (totalt antall celler i hele grid).	WBC etter anrikning, Celler/ μ l.	Totalt antall WBC i 1000 μ l etter anrikning.
A	33	41	41000
B	29	36	36000

Forsøket viser at det i spikede blodprøvene som i utgangspunktet ble tilsatt 10^5 MDA MB 468 celler etter anrikning og telling i tellekammer finnes mellom $((1 - 1,7) * 10^5)$ brystkreftceller. Det er et høyere antall enn det vi tilsatte. Forsøket viser også det ved anrikning av kreftceller fra 5 ml blodprøver, følger med $((3,6 - 4,1) * 10^4)$ hvite blodceller.

3.5. Effektivitetsstudie

Effektiviteten i de ulike trinnene i prosedyren for påvisning av sirkulerende brystkreftceller; RNA isolering, cDNA tillaging, prosedyre for oppkonsentrering av cDNA og anrikning ble undersøkt.

3.5.1. RNA – isolering

Hensikten er å sjekke effektiviteten på prosedyren for tillaging av RNA. Ratioen mellom målt absorpsjon ved 260 nm og absorpsjon målt ved 280 nm gir et estimat på renheten av RNA i forhold til kontaminerende substanser som absorberer UV lys som for eksempel proteiner. Rent RNA har en A_{260}/A_{280} – ratio mellom 1,9 – 2,1.

Bruker cellelinjen for ZR-75-1: Celletelling viser: $3.3 \cdot 10^3$ celler/ μ l. Tilfører et volum tilsvarende $1 \cdot 10^6$ til 4 ulike rør (305 μ l). Følger deretter prosedyre for RNA isolering som beskrevet tidligere.

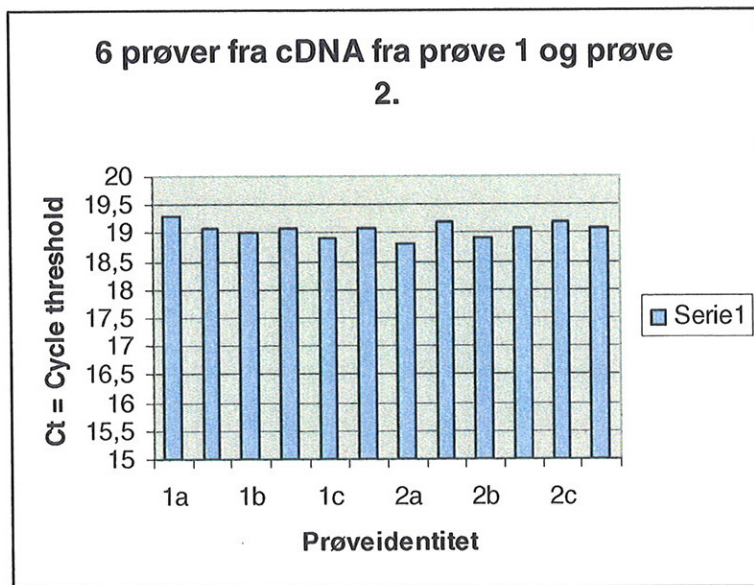
Tabell 8: Bestemmelse av konsentrasjonene og renheten av RNA i $1 \cdot 10^6$ Zr75-1 celler i fire ulike prøver målt ved hjelp av absorpsjonsmålinger ved 260 nm og 280 nm i spektrofotometer.

Sample :	Abs 260 nm	Abs 280 nm	(Abs260/Abs 280)	1 μ g tot RNA= x μ l	Tot. μ gRNA i 50 μ l
1	0,079	0,039	2,0	7,91	6,32
2	0,08	0,038	2,1	7,81	6,4
3	0,075	0,037	2,0	8,33	6
4	0,073	0,036	2,0	8,56	5,84

Vi ser at de 4 prøvenes totale RNA i 50 μ l RNase fritt vann varierer fra 5,84 til 6,4 μ g. RNA i prøvene har høy renhet siden A_{260}/A_{280} nm ligger mellom 2,0 -2,1.

3.5.2. cDNA tillagingsprosedyre og effektivitet og real time PCR

Bruker prøve 1 og 2 fra eksperiment 3.5.1 for å lage cDNA siden disse prøvene har tilnærmet like mengder RNA, hhv. 6,32 og 6,4 μ g. Lager 3 rør med cDNA fra henholdsvis prøve 1 og 2, til sammen 6 rør. Lager cDNA av 1 μ g av totalt RNA for hvert av de seks rørene. Deretter ble prøvematerialet brukt i CK 19 PCR hvor det ble tilsatt 2 μ l cDNA til totalt 50 μ l.



Figur 6: Viser C_t -resultater for CK19-PCR, $T_{ann}=60^{\circ}C$ i 6 sykluser og $T_{ann}=56^{\circ}C$ i 38 sykluser i tre parallelle prøver av prøve 1 og tre parallelle av prøve 2. Vi ser at de seks prøvene med 1 μg cDNA tillaget fra seks forskjellige prøver har C_t -verdier som varierer fra 18,8 til 19,3.

3.5.3: Oppkonsentrering av cDNA

Ønsker å vurdere om oppkonsentrering-prosedyren er effektiv, det vil si at prøven kommer opp med lavere C_t - verdier sammenliknet med ikke konsentrert prøve.

I eksperiment 1 oppkonsentrerer vi prøvene fra tabell 9 i henhold til prosedyren fra 45 μl cDNA til 7 μl . I eksperiment 2 oppkonsentrerer vi prøvene fra tabell 4 under i fra 42 μl til 7 μl cDNA.

Resultatene kommer fra to ulike eksperimenter.

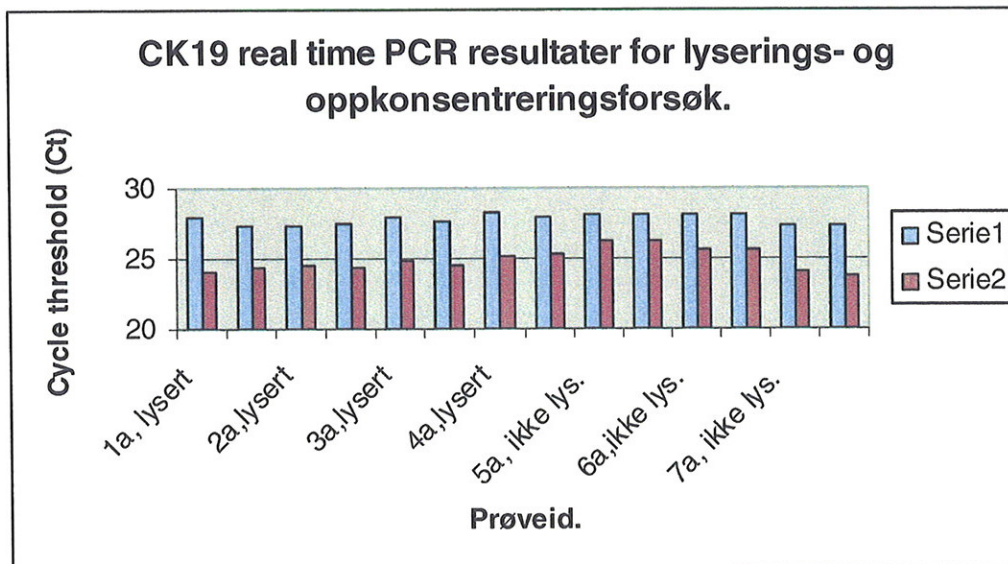
Tabell 8: Eksperiment 1. Viser C_t -verdier for CK19-PCR, $T_{ann}=60^{\circ}c$ i 6 sykluser og $T_{ann}=56^{\circ}c$ i 38 sykluser for tre paralleller av prøve 1 og tre paralleller av prøve 2 etter oppkonsentrering av prøvene fra 45 μl til 7 μl .

Prøve	C_t , CK 19. Ikke oppkonsentrert prøve	C_t , CK19. Oppkonsentrert prøve
1a	19,3	20,2
	19,1	20,2
1b	19,0	20,1
	19,1	20,1
1c	18,9	20,0
	19,1	19,8
2a	18,8	19,3
	19,2	19,2
2b	18,9	19,2
	19,1	19,3
2c	19,2	20,2
	19,1	20,1

Vi ser at prøvene etter utført etanolfelling, dvs oppkonsentreringsprosedyre får høyere C_t -verdier, dvs. lavere konsentrasjon av templat, sammenlignet med C_t -verdier før etanolfellingsprosedyre.

Tabell 9:

Prøve	C_t = ikke oppkonsentrert prøve	C_t = oppkonsentrert prøve	Middel $\Delta C_t(C_t, ikke oppkons. - C_t, oppkons)$
1 , lysert	28,0	24,1	
	27,3	24,4	3,4
2 , lysert	27,3	24,5	
	27,5	24,3	3
3, lysert	27,9	24,8	
	27,6	24,5	3,1
4, lysert	28,3	25,1	
	28,0	25,3	3,0
5, ikke lysert	28,2	26,3	
	28,2	26,3	2
6, ikke lysert	28,2	25,6	
	28,2	25,6	2,6
7, ikke lysert	27,4	24	
	27,3	23,7	3,5



Figur 7: Eksperiment 2 viser C_t -verdier for CK19-PCR, $T_{ann}=60^{\circ}\text{C}$ i 6 sykluser og $T_{ann}=56^{\circ}\text{C}$ i 38 sykluser. I 4 prøver ble de røde blodcellene lysert og tre ikke ble de ikke lysert (Spikingsforsøk med 5 ml NPB tilsatt $1 \cdot 10^3$ MDA MB 468 celler, ikke brukt DNase). Blå serie er C_t -verdier fra prøver som er hhv lysert eller ikke lysert i anrikningsprosessen. Rød serie representerer C_t -verdier fra det samme prøvematerialet (cDNA) som har blitt oppkonsentrert ved hjelp av etanolfellingsprosedyre.

3.5.4: Anrikning med eller uten ammoniumkloridlysering av røde blodceller

Forsøk for å vurdere om lyseringssteget i anrikningsprosedyren ble gjennomført eller

Syv blodprøver á 5 ml fra blodgivere ble tilsatt 10^3 MDA MB 468 celler. Det ble også inkludert en negativ kontroll bestående av 5 ml normalt perifert blod uten cancerceller.

Etter anrikning i 30 minutter, ble de røde blodcellene lysert prøvene 1, 2, 3 og 4 og

nullprøven ved hjelp av ammoniumklorid (Orthos lyseringsløsning forhold:1/5). Prøve 5, 6 og 7 ble ikke behandlet.

Prøvematerialet ble resuspendert i 800 μl vaskebuffer. Etter RNA- isolering ble prøvene kjørt på Taqman CK 19 PCR.

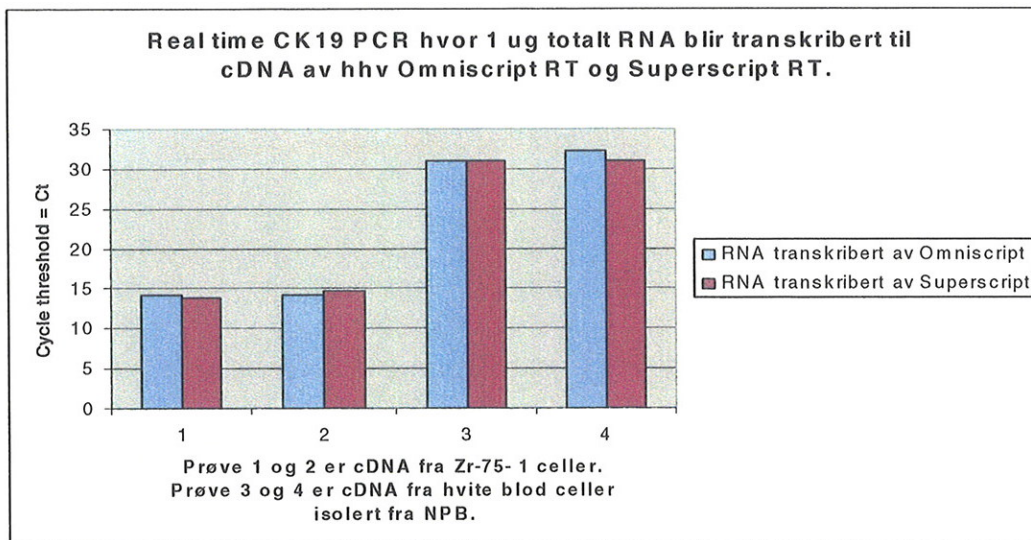
Tabell 10: Viser C_t - verdier for prøve 1, 2, 3 og 4 som har blitt lysert og prøvene 5, 6 og 7 som ikke har blitt lysert. (CK19 PCR, $T_{ann}=60^{\circ}c$ for 6 sykluser og $T_{ann}=56^{\circ}c$ for 38 sykluser). Disse verdiene er fra før oppkonsentrering.

	$C_t = \text{Cycle Threshold, CK19}$
1, lysert	28,0
	27,3
2, lysert	27,3
	27,3
3, lysert	27,9
	27,6
4, lysert	28,3
	28,0
5, ikke lysert	28,2
	28,2
6, ikke lysert	28,2
	28,2
7, ikke lysert	27,4
	27,3

Se figur 7 over.

3.6. cDNA syntese; sammenligning av to ulike kit for revers transkriptaser; Omniscript revers transcriptase versus Superscript RT

Vi ønsket å teste ut et alternativt kit for revers transkriptase med bakgrunn i at fabrikanten hevder at det nyeste kittet (Omniscrypt RT) skulle være gi høyere sensitivitet, dvs gi lavere C_t verdier sammenlignet med kittet som ble benyttet; Superscript RT.

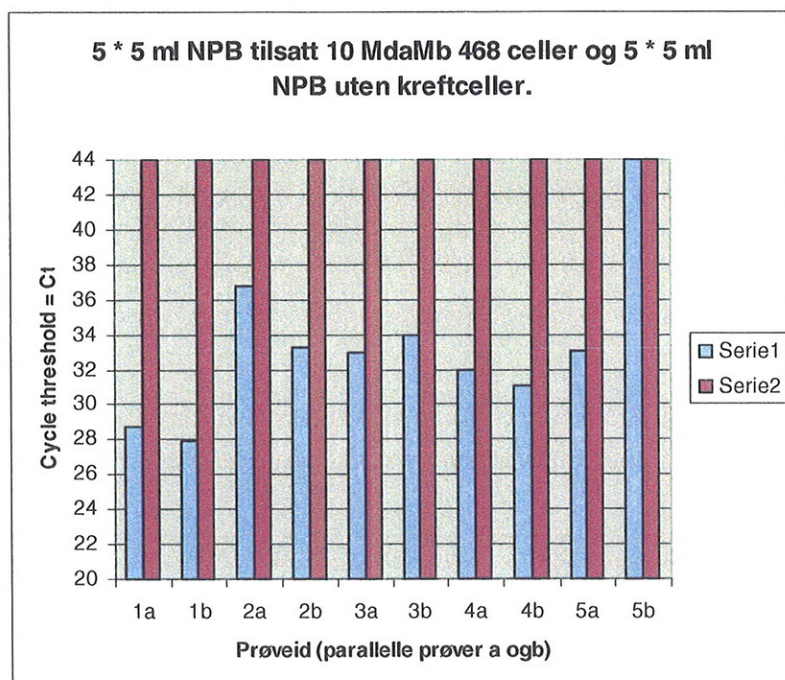


Figur 9: Real time CK 19 PCR hvor prøvematerialet er 1 ug totalt RNA fra ZR-75-1 celler og hvite blodceller fra normalt perifert blod transkribert til cDNA . Prøve 1 og 2 er fra Zr-75-1 kreftceller og prøve 3 og 4 er hvite blodceller.

Våre forsøk viste ingen forskjell i effektiviteten av de to enzymene (Fig.9).

3.7. Spiking forsøk med 10 MDA MB 468 celler i 5ml NPB

Blodprøver fra 5 friske givere (5ml) ble tilsatt 10 brystkreftceller, og prosedyren ble gjennomført for å finne ut om det var mulig å påvise signal for CK19 RNA. Blodprøver uten tilsatte brystkreftceller ble brukt som kontroll. I alle prøvene med kreftceller fikk man et CK19 signal med en Ct verdi lavere enn normal prøve (tabell 12, figur 8).

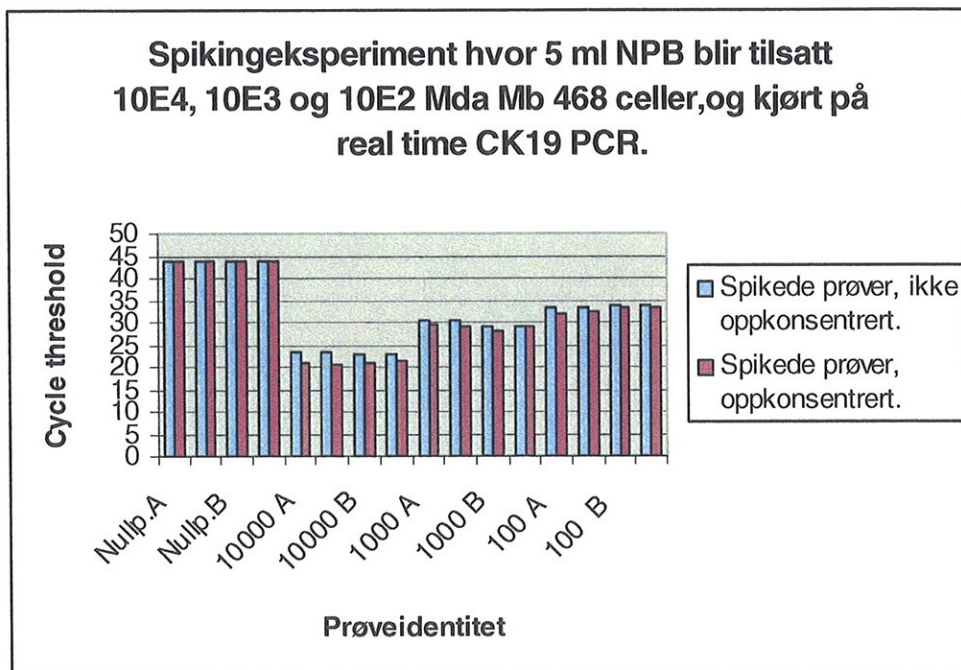


Figur 8: Viser Ct- verdier for spikede og ikke spikede blodprøver for cDNA fra mRNA transkriptene for CK 19. Ct-verdier for normale perifere blodprøver à 5 ml tilsatt (spiket med) 10 MDA MB 468 kreftceller. Prøvene er kjørt parallelt hvor a og b representerer paralleller.

Vi ser at det er konsistente forskjeller mellom nullprøver og spiket fullblod tilsatt 10 brystkreftceller.

3.8. Standardkurve basert på 10 fold fortyning av kreftceller i normalt blod.

10 blodprøver à 5 ml NPB ble tilsatt hhv. 10^4 , 10^3 og 10^2 MDA MB 468 celler og 125 μ l magnetiske kuler. RNA og cDNA prosedyre ble utført i henhold til prosedyrer. CK19 PCR ble kjørt på Taqman ved $T_{ann}=60^\circ\text{C}$ i 6 sykluser og $T_{ann}=56^\circ\text{C}$ (10/8) for å evaluere om det var mulig å lage en standardkurve basert på fortyning av kreftceller i normalt blod.



Figur 10: Viser C_t -verdier for CK 19 PCR ved $T_{ann}=60^\circ\text{C}$ i 6 sykluser og $T_{ann}=56^\circ\text{C}$ i 38 sykluser. De normale perifere blodprøvene på 5 ml ble tilsatt hhv 10^4 , 10^3 og 10^2 MDA MB 468 celler.

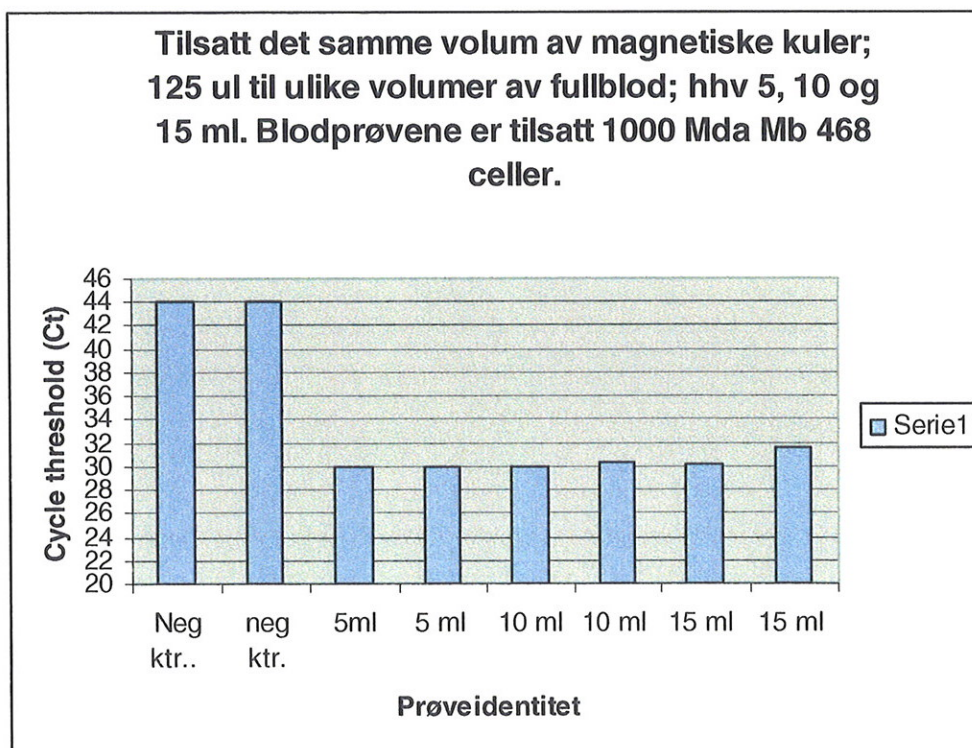
Terskelverdi er satt til 0,01 og baseline defineres utfra syklus 3 til 11.

Det var konsistente og tydelige forskjeller på mengde CK19 RNA basert på det ulike antall celler som ble tilført. Forskjellene mellom 10000 og 1000 celler var mer enn 3 sykluser, mens forholdet mellom 1000 og 100 celler som forventet var ca. 3 sykluser. Resultatene representerte ikke en ideell standardkurve.

3.9. Optimalisering av antall kuler i forbindelse med anrikingssteget.

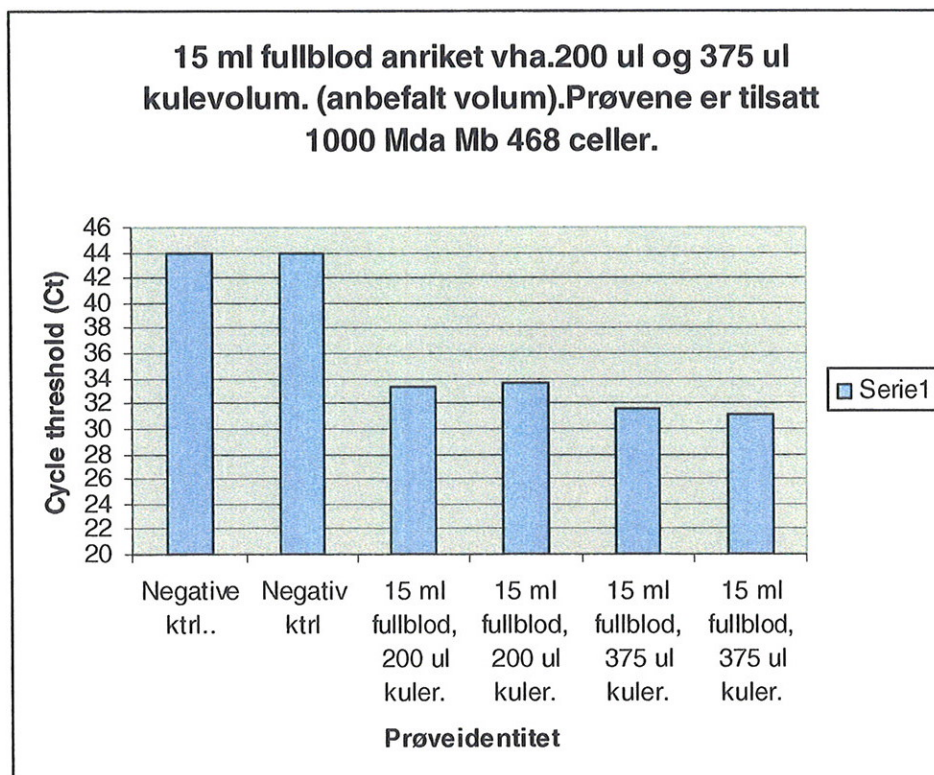
Forsøk ble gjennomført for å finne ut om det anbefalte volumet for magnetiske kuler som er 125 μ l for 5 ml fullblod er tilstrekkelig for større volumer av fullblod, hhv 5, 10 og 15 ml.

Magnetiske kuler er kostbare, og det ville være hensiktsmessig om man kunne bruke mindre volumer enn anbefalt.



Figur 12: C_t verdier for CK 19 PCR for de ulike blodprøvene (fullblod) som er tilsatt 10^3 MDA MB 468 celler. Prøvene tilsettes likt kule-volum (125 μ l).

Kulevolumet på 125 μ l synes å gi en liten forskjell (2sykler) ved anrikning i 5 ml sammenliknet med 15 ml blod. Det samme resultatet ble oppnådd i spiking eksperiment med to 15 ml fullblodsprøver tilsatt 10^3 MDA MB 468 celler. Den ene prøven blir anriket med anbefalt volum av magnetiske kuler som er 375 μ l og den andre ble anriket med 200 μ l kulevolum.



Figur 13: Ct verdier fra CK 19 PCR kjørt ved betingelser oppgitt i materiale/metode kapittel.

3.10. Undersøkelser av blodprøver fra kvinner med metastatisk brystkreftsykdom.

Dyrkede brystreftceller ble vist å ikke være ideelle for å etablere en standardkurve for kvantitering av CK19 genprodukt i ukjent prøve og en standardkurve basert på plasmider med CK 19 ble etablert. Standardkurver for plasmidmaterialet har blitt kalkulert utfra lineær regresjonsanalyse. Standardkurven for de ulike transkriptene viser en lineær sammenheng mellom C_t verdier og logaritmen til plasmid kopitallet. Standardkurven viser en lineær sammenheng fra 10^6 til 10^1 kopier. Mengden kopier i pasientprøvene bestemmes utfra regresjonslinjene for standardkurvene.

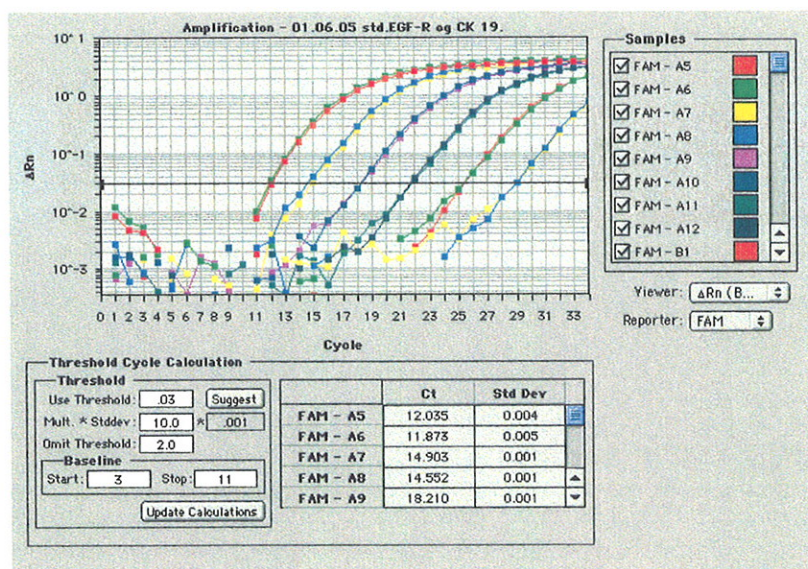
Annealingtemperaturen for real time PCR har blitt endret fra $60/56^\circ\text{C}$ til $60/58^\circ\text{C}$ på bakgrunn av analyseforsøk. Det har også blitt definert en cut off verdi = 36 med bakgrunn i at analysen har vært utført for 30 blodprøver fra friske personer.

For å definere standardkurver, har plasmidmateriale blitt fortynnet og kjørt på real time PCR

med konsentrasjoner fra 10^6 til 10^1 kopier per 5 μl i 20 μl mastermix. Baseline defineres utfra syklus 3-11 og terskellinje er satt til 0,03.

Blodprøver fra 12 pasienter med metastatisk brystkreftsykdom har blitt kjørt på real time PCR for CK 19, EGF-R og B2M samme dag rett etter standardkurve materialet har vært kjørt. Pasientprøvene med volumer på 15 ml har vært anriket og isolert RNA fra senest dagen etter ankomst til laboratoriet, og har vært oppbevart i kjøleskap i mellomtiden. Det har vært tillaget cDNA rett etter RNA isolering. cDNA har vært oppbevart ved -20°C . Ved analyse på real time PCR har det vært benyttet et volum på 4 μl cDNA fra pasientprøvene til 21 μl mastermix. Totalvolum av cDNA etter RT reaksjon er 50 μl , og dersom man bruker 4 μl per brønn, er det materiale nok til 2 analyser for hvert av de tre transkriptene, dvs. at man kan gjenta oppsettet en gang og hver prøve representerer 1,2 ml prøvemateriale fra pasient. Alle prøvene kjøres med paralleller i real time analyse oppsettet.

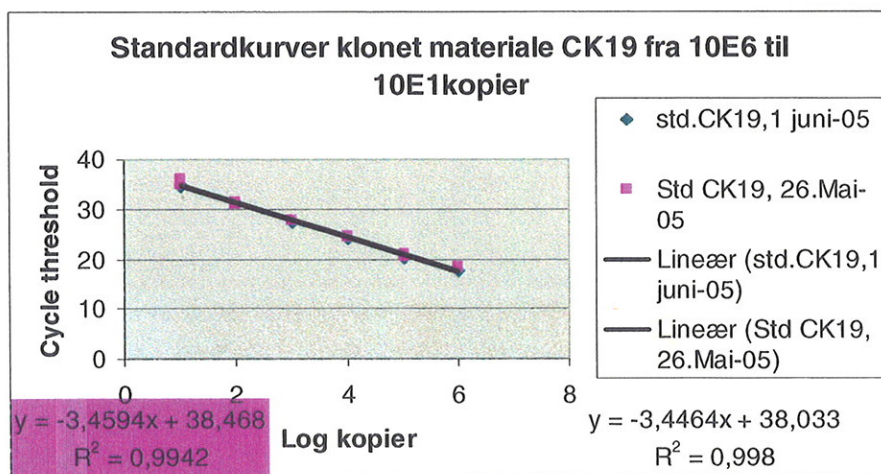
3.10.1. Standardkurver med klonet materiale for de tre transkriptene; CK19, EGF-R og B2M.



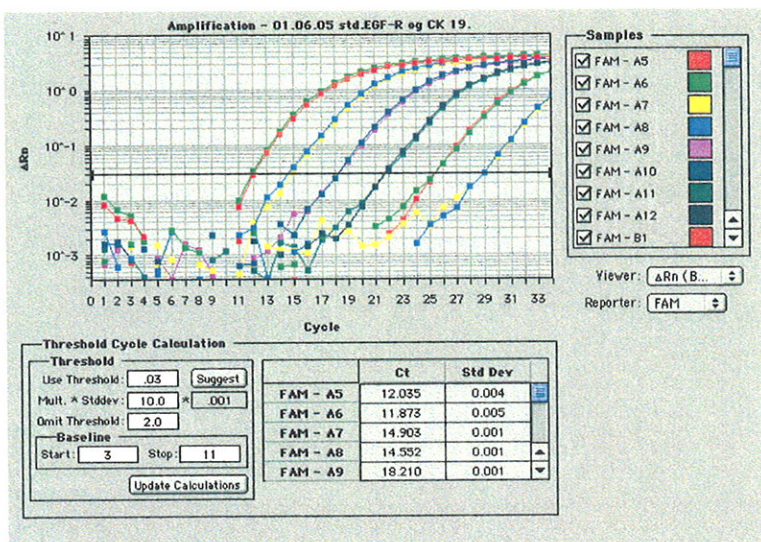
Figur 14: Viser fortynningsrekke av klonet materiale for CK19 fra 10^6 til 10^1 kopier. Tilsatt 5 μl prøve til 20 μl mastermix. Figuren viser at det er rundt 3 sykluser mellom hver 10 faldsfortynning.

Tabell 17: Viser reelle C_t-verdier for CK 19 klonet materiale fra 2 ulike kjøringene for for å vise variasjon mellom ulike batcher av fortynningsrekker.

STANDARDKURVE for klonet CK19 to standardkurver fra ulike dager og ulike tillaging (samme utgangrør ca. 10 8)			
Ant kopier		01.jun	26.mai
pr 5 µl	Log ant kop	Ct	Ct
1000000	6	17,83	18,35
1000000	6	17,73	18,21
100000	5	20,64	20,83
100000	5	20,36	20,64
10000	4	24,01	24,62
10000	4	24,08	24,54
1000	3	27,46	27,91
1000	3	27,54	27,59
100	2	31,23	31,45
100	2	31,2	31,11
10	1	34,77	35,95
10	1	34,8	35,12



Figur 15: Viser regresjonslinja med korrelasjonskoeffisient for de to kjøringene for CK 19 fra hhv. 26.mai og 1.juni. Ved beregning av antall kopier CK 19 i pas.prøver, benyttes regresjonslinja for 1.juni. Stigningstallet er 3,4/3,5 som forteller oss at det er 3,4/3,5 sykluser mellom hver log fortykning. Det ideelle er at stigningstallet er 3,3 mens det akseptable er et stigningstall mellom 3,3 – 3,9. Korrelasjonskoeffisient = 0,99 som forteller at punktene ligger tett opp til regresjonslinjene oppgitt.

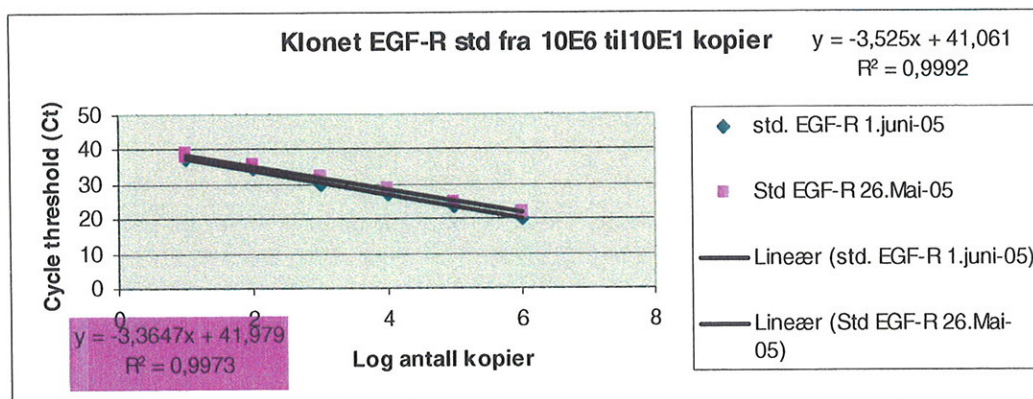


Figur 16: Viser utskrift fra abi prism maskinen for fortynningsrekke av klonet materiale for EGF-R fra 10^6 til 10^1 kopier.

Tilsatt 5 µl prøve til 20 µl mastermix.

Tabell 18: Viser reelle Ct verdier for klonet EGF-R materiale fra 2 ulike kjøringar for å vise variasjon mellom ulike batcher av fortynningsrekker.

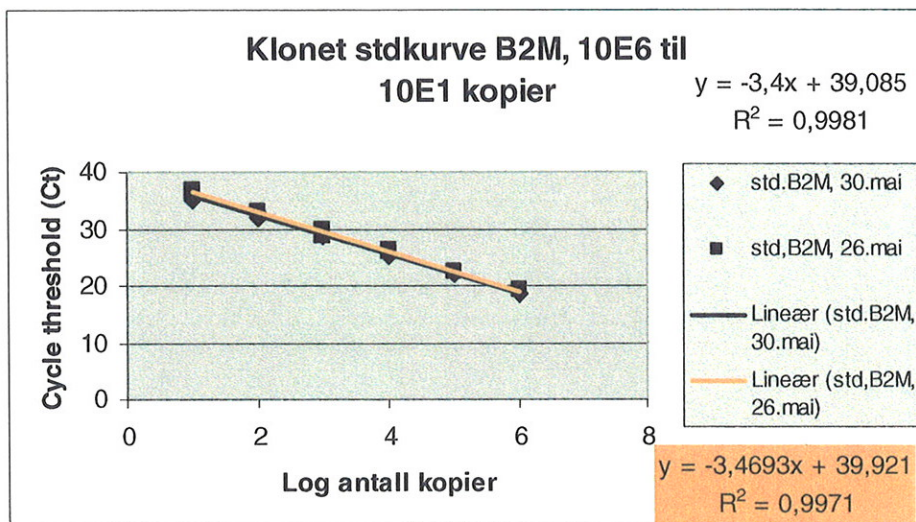
STANDARDKURVE for klonet EGF-R			
Ant kopier		01.jun	26.mai
pr 5 µl	Log ant kop	Ct	Ct
1000000	6	20,11	22,03
1000000	6	19,96	21,99
100000	5	23,33	24,78
100000	5	23,41	24,95
10000	4	26,88	28,61
10000	4	26,96	28,33
1000	3	30,14	32,22
1000	3	30,4	31,63
100	2	34,2	35,29
100	2	34,23	35,48
10	1	37,53	39,06
10	1		38,06



Figur 17: Viser regresjonslinja med korrelasjonskoeffisient for de to kjøringene fra hhv. 26.mai og 1.juni. Ved beregning av antall kopier EGF-R i pas.prøver, benyttes regresjonslinja for 1.juni. Stigningstallet er 3,4 som forteller oss at det er 3,4 sykluser mellom hver log fortyning. Det ideelle er at stigningstallet er 3,3 mens det akseptable er et stigningstall mellom 3,3 – 3,9. Korrelasjonskoeffisient = 0,99 som forteller at punktene ligger tett opp til regresjonslinjene oppgitt.

Tabell 19: Viser reelle Ct verdier for klonet β_2M -materiale fra 2 ulike kjøring for å vise variasjon mellom ulike batcher av fortyningsrekker.

STANDARDKURVE for klonet β_2M			
Ant kopier		30.mai	26.mai
pr5 μ l	Log ant kop	Ct	Ct
1000000	6	18,49	19,43
1000000	6	18,7	
100000	5	22,14	22,46
100000	5	22,26	22,41
10000	4	25,55	26,2
10000	4	25,37	26,07
1000	3	28,94	28,74
1000	3	28,94	29,75
100	2	32,02	33,12
100	2	32,46	32,87
10	1	35,13	36,82
10	1	36,22	36,37

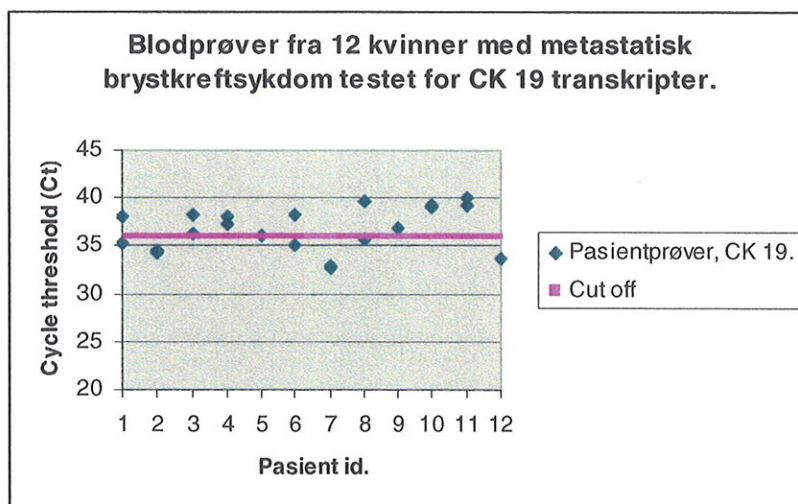


Figur 18: Viser regresjonslinjen med korrelasjonskoeffisient for β_2M for de to kjøringene fra hhv. 26.mai og 30.mai. Ved beregning av antall kopier β_2M i pas.prøver, benyttes regresjonslinja for 30.mai. Stigningstallet er -3,4 som forteller oss at det er 3,4 sykluser mellom hver log fortykning. Det ideelle er at stigningstallet er 3,3 mens det akseptable er et stigningstall mellom 3,3 – 3,9. Korrelasjonskoeffisient = 0,99 som forteller at punktene ligger tett opp til regresjonslinjene oppgitt.

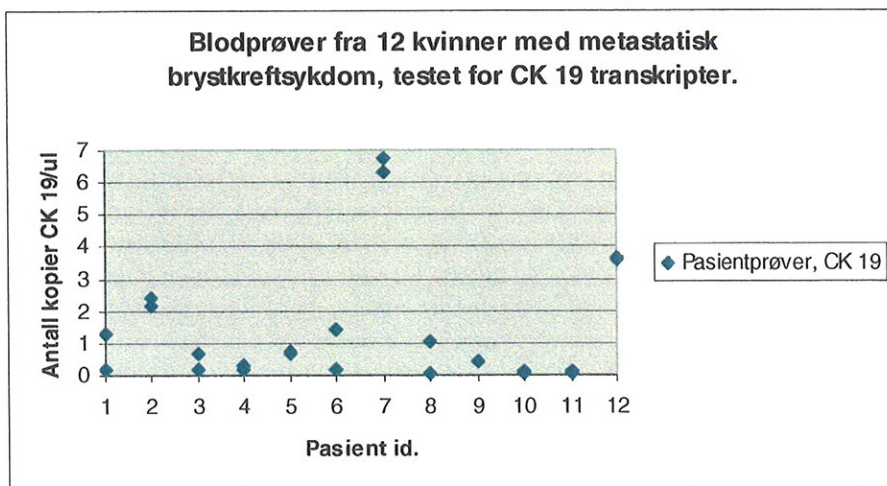
3.10.2. Resultater av analyse av blodprøver fra 12 kvinner med metastatisk brystkreftsykdom

Tabell 20: Viser reelle C_t -verdier for alle tre transkriptene; β_2M , CK 19 og EGF-R for 12 blodprøver fra kvinner med metastatisk brystkreftsykdom. Prøvene har blitt anrikt, RNA er isolert og cDNA laget før real time PCR ble kjørt. Det ble tilsatt 4 μ l cDNA til 21 μ l mastermix. Vi ser at alle C_t verdier for påvisning av EGF-R transkripter i blodprøvene fra kvinnene med brystkreftsykdom er negative, i.e. de kommer opp ved $C_t=40$. Dette betyr at det ved terminering av PCR analysen ikke har vært påvist EGF-R produkter.

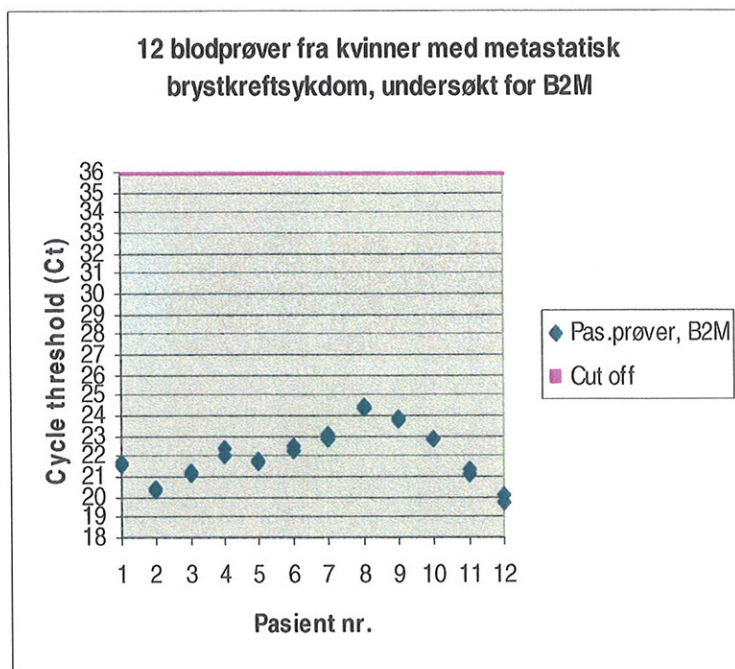
Pasid.	C_t , CK 19	C_t , EGF-R	C_t , β_2M
1	35,21	40	21,75
1	37,97	40	21,58
2	34,31	40	20,35
2	34,45	40	20,45
3	36,26	40	21,21
3	38,28	40	21,17
4	37,97	40	22,33
4	37,32	40	22,07
5	36,12	40	21,74
5	36,15	40	21,84
6	38,25	40	22,32
6	35,12	40	22,51
7	32,86	40	23,02
7	32,77	40	22,87
8	39,64	40	24,48
8	35,59	40	24,35
9	36,88	40	23,74
9	36,81	40	23,85
10	39,29	40	22,81
10	39,14	40	22,87
11	39,15	40	21,32
11	40	40	21,09
12	33,68	40	20,12
12	33,7	40	19,73



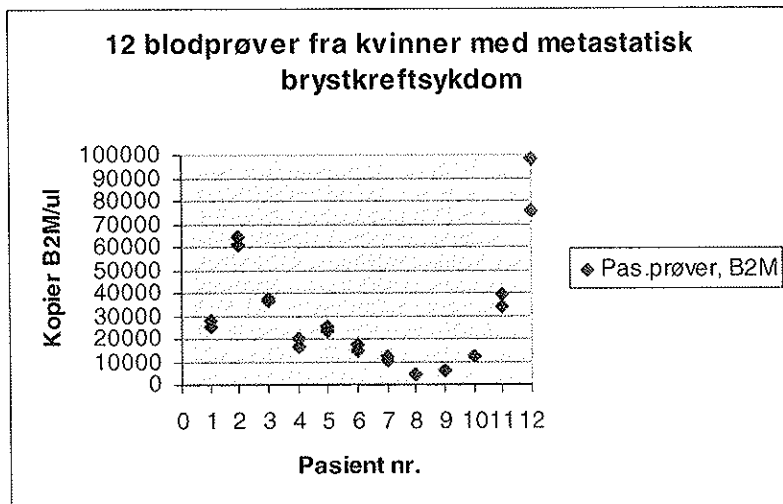
Figur 19: Viser parallelle C_t -verdier for CK 19 for pasientprøver. Cut off er ved $C_t=36$.



Figur 20: Viser hvor mange kopier CK 19/µl det er i 12 blodprøver fra kvinner med brystkreft.



Figur 23: Viser parallelle Ct verdier for B2M for pasient prøver. Cut off er satt til Ct =36.



Figur 24: Viser hvor mange kopier/μl av β₂M som finnes i 12 pas.prøver. Antall kopier i prøvene er beregnet utfra

4. Diskusjon

4.1. Testing av friske blodgivere, hvor spesifikk er analysen?

I denne metoden for påvisning av sirkulerende brystkreftceller, har vi kombinert en positiv anrikningsprosedyre basert på monoklonale antistoffer bundet til magnetiske kuler rettet mot EpCAM på brystkreftcellene, og en real time PCR metode basert på påvisning av to ulike transkripter, EGF-R og CK19, som har forhøyet ekspresjon i en stor andel av brystkreftcellene.

Det er rapportert at det ved bruk av RT-PCR teknikker kan forekomme falske positive resultater ved påvisning av transkriptet for CK 19. Falske positive resultater kan skyldes amplifikasjon av illegitimt transkribert CK19 av hematopoietiske celler, amplifikasjon av CK 19 pseudogener fra kontaminerende genomisk DNA eller amplifikasjon av CK 19 transkripter fra kontaminerende epitelceller (15,23).

Ved valg av primere og probe for CK 19 ble det tatt hensyn til at det finnes to pseudogener som har svært lik nukleotidsekvens sammenliknet med CK 19, og primere og probe ble lagt til områder med størst mulig variabilitet for CK 19 og pseudogenene, CK 19a og CK19b.

Til tross for dette, viste forsøk med cDNA (av 1 µg totalt RNA) isolert fra ca. $1 \cdot 10^7$ mononukleær celleduspensjon fra blodgivere at disse fikk en Ct verdi for CK 19 fra ca. 32 til 37. Tilsvarende prøvemateriale hvor det underveis i RNA isolering hadde blitt brukt DNase ga en C_t verdi for CK 19 fra 38,5 til 40. Med bakgrunn i disse resultatene inkluderte vi derfor tidlig bruk av DNase underveis i RNA isoleringsprosedyren for alle prøvene. Tanken bak bruk av DNase underveis i RNA isoleringsprosedyren, er at den ødelegger kontaminerende DNA som inneholder pseudogener som har en nukleotidsekvens svært lik Cytokeratin 19 (Pseudogenene kalles CK 19a og CK 19b). For å redusere muligheten for falske positive resultater, ser det ut som om det er nødvendig å inkludere DNase i RNA isoleringstrinnet. Ved anrikning av brystkreftceller fra perifert blod, vil imidlertid ikke cDNA fra hvite blodceller utgå fra 1 µg totalt RNA, men fra langt mindre mengder. Ved

anrikningsforsøk gjort senere, fant vi at det ved anrikning av 10 friske blodprøver (såkalte nullprøver) med volum på 5 ml, ikke kom opp detekterbare signaler før syklus 40, d.v.s. den siste syklusen i analysen. C_t -verdier for APRT viser at de ulike stegene i analysen har fungert, og forteller også at det har blitt anriket celler (hvite blodceller) som uttrykker transkripter for APRT.

Kontaminering av epitelceller ved blodprøvetagning, vil kunne unngås ved at de første 5 ml av blodprøven tas på et eget glass og kastes før selve blodprøven til analysering tas.

Med hensyn til illegitim transkripsjon som også vil kunne bidra til lavgradige signaler i analysen, kan dette være et bidrag fra hematopoietiske celler. Illegitim transkripsjon kan defineres som transkripsjon av vevsspesifikke gener på et lavt nivå av ikke spesifikke celler, og er estimert til å være rundt 1 kopi per 100 til 1000 celler (23). Illegitim transkripsjon kan ikke elimineres, men dersom man vet hvilket nivå (syklus) denne illegitime transkripsjonen ligger rundt, kan det defineres en cut-off verdi for analysen. Feks. cut off verdi ved $C_t=36$, noe som betyr at alle prøver som kommer opp med en C_t verdi høyere enn 36, defineres som negative. Vi har gjort forsøk for å vise hvor mange hvite blodceller som fjernes, evt blir igjen i blodprøvene etter anrikningsprosedyren med tanke på at de hvite blodcellene kan bidra til illegitim transkripsjon. Resultatene i tabell 5 viser at celletallet for hvite blodceller før og etter anrikning er nokså likt. For to blodprøver er det celletallet for hvite målt vha. Sysmex celledetektor, likt før og etter anrikning. Dette er hva man ønsker; at man via anrikning kvitter seg med alt av den hvite celle bakgrunnen for nettopp å unngå illegitim transkripsjon. For en prøve har celletallet økt etter anrikning med $0,1 * 10^7$ celler sett i forhold til før anrikning. For en prøve er celletallet etter anrikning $0,1 * 10^7$ celler lavere enn sammenlignet med før anrikning. Tolk dette dithen at Sysmex celledetektor ikke er helt nøyaktig ved konsentrasjoner på $0,1 * 10^3$ celler/ μ l. Det ble gjort forsøk på celledetelling av gjenværende hvite blodceller etter anrikning samt telling av kreftceller ved hjelp av tellekammer. Disse resultatene indikerer at det ved anrikning av 5 ml blodprøver følger med fra $3,6-4,1 * 10^4$

blodceller. Det samme forsøket viste ikke tegn til at hvite blodceller fagocytorer magnetiske kuler sannsynligvis fordi temperaturen holdes lav i hele forsøket (+4°C).

Det samme forsøket viste ikke tap av brystkreftceller av linje MDA MB 468 i supernatanter. Celletellingene for kreftceller i de anrikede prøvene indikerer et høyere celletall i prøvene enn det vi tilsatte av celler. Dette kan skyldes at kreftcellene har tendens til å adherere, og det ved tilsetning av ønsket antall celler, følger med flere enn beregnet pga. cellenes tendens til adhesjon.

Disse forsøkene og resonneringene rundt dem er basert på et lite prøveantall, og forsøkene burde derfor vært repetert for statistisk bearbeidelse.

4.2. Evaluering av effektivitet i de ulike analysetrinnene.

Det er forsøkt gjort en evaluering av de ulike trinnene i analysen, for om mulig å se om de ulike stegene underveis i analysen er reproducerbare.

4.2.1. Anrikningsprosedyre.

Det ble i starten av arbeidet med metoden, gjort ulike optimaliseringsforsøk av anrikningsprosedyren. Blant annet ble det forsøkt brukt ammoniumklorid lysesløsning for å lysere røde blodceller med tanke på at disse kunne interferere i analysene som følger etter anrikningsprosedyren, dvs RNA-isoleringsprosedyre og RT-reaksjon. Forsøkene som ble gjort med 5 ml blod spiket med 10^3 brystkreftceller viste imidlertid ikke at prøver behandlet med ammoniumklorid ble detektert tidligere ved real time PCR for CK19, sammenlignet med prøver som ikke var blitt behandlet med ammoniumklorid. De lyserte prøvenes C_T -verdier for CK 19, varierer fra 27,3 til 28. De tre prøvene som ikke ble lysert varierer mht. til C_T -verdier fra 27,3 til 28,2. Anrikningsprosedyren synes å være reproducerbar fra prøve til prøve, og de ulike prøvene som ble tilsatt lik mengde celler, fikk tilnærmet like resultater. Dette innebærer at vi i løpet av anrikningsprosedyren kan fjerne lysessteget noe som gir en enklere anrikningsprosedyre.

Det har også vært gjort forsøk for å kunne vise hvor stort tap av kreftceller det er i løpet av anrikningsprosedyren. Resultatene var inkonklusive. Brystkreftceller dyrket i kultur har

tendens til å adhere til hverandre, cellene klumper seg sammen. Dette skjer til tross for at cellesuspensjonen passereres gjennom en kanyle med liten diameter rett før cellene skal tilføres for eksempel blodprøver. Forsøk som har vært gjort, har derfor ikke gitt svar på hvor stort tapet av brystkreftcellene er i løpet av selve anrikningsprosedyren.

Det har vært forsøkt brukt lavere konsentrasjoner av magnetiske kuler enn anbefalt for gitte blodvolumer. Forsøkene viste imidlertid at spikede prøver tilsatt mindre kuler enn anbefalt ble detektert senere sammenlignet med prøver som var anrikt med anbefalt mengde kuler. Forsøk ved laboratoriet her har som tidligere nevnt, vist at noen brystkreftcellelinjer ikke uttrykker EpCam, som er molekylet de monoklonale antistoffer på magnetiske kuler er rettet mot (21). Dette kan være tilfelle for sirkulerende brystkreftceller in vivo, og vil dermed representere en feilkilde som vil gi falske negative prøver. Med bakgrunn i våre resultater bruker vi anbefalt mengde kuler (375ul) til anrikning av brystkreftceller fra 15 ml blod.

4.2.2. RNA-isolering.

RNA-isoleringstrinnet har vært evaluert gjennom analyse av fire prøver bestående av $1 * 10^6$ brystkreftceller. Spektrofotometriske absorbansmålinger av det isolerte RNA innholdet i 4 prøver viser en høy grad av renhet for RNA med bakgrunn i en ratio mellom 260 nm og 280 nm tilnærmet lik 2. Totalt RNA innhold i de 4 prøvene varierer mellom 5,84 og 6,4 µg.

Forskjellen i resultatene kan komme av at noen av cellene ikke har vært enkeltceller, men at det har forekommet en tendens til klumping av cellene. Andre eksperimenter har vist at ZR 75-1 cellene har sterke adherente egenskaper.

4.2.3. RT-reaksjon og tillaging av cDNA.

Det neste trinnet som er evaluert er tillaging av cDNA ved hjelp av revers transkriptase. Dette er gjort ved å lage cDNA fra 6 prøver som i utgangspunktet hadde nokså lik konsentrasjon av RNA (totalt RNA isolert fra $1 * 10^6$ Zr 75-1 celler). Dersom revers transkriptase enzymet eller teknikken ikke fungerte optimalt, ville vi forvente å se at de seks

prøvene ville få ulike C_t -verdier for CK 19 ved kjøring på PCR.

Det vi observerer er at C_t -verdiene er tilnærmet lik for de seks prøvene. C_t -verdiene varierer fra 12,8-13,3 for CK 19. Konkluderer med at det har vært god effektivitet i prosedyren for tillaging av cDNA og selve i real time prosedyren. Ved dette forsøket, ble det imidlertid isolert totalt RNA fra et høyt antall celler $1 * 10^6$.

Ved analysing av pasientprøver forventer vi at antallet sirkulerende brystkreftceller kan være svært lavt. Totalt isolert mengde RNA fra disse prøvene blir derfor svært lavt, og det lar seg ikke gjøre å kvantitere total mengde RNA ved hjelp av spektrofotometeret som er ved avdelingen. Det kan tenkes at RT enzymet ikke transkriberer mRNA til cDNA så godt ved lave konsentrasjoner av totalt RNA som ved høye konsentrasjoner. Det er derfor inkludert såkalte housekeeping gener i analysen, som uttrykkes konstitutivt i alle celler, og C_t -verdier for disse vil vise om RNA og tillaging av cDNA har vært mislykket.

Det har blitt prøvet ut et alternativt kit med en annen revers transkriptase (Omniscrypt) enn den vi bruker, men resultatene her indikerer ikke vesentlige forskjeller (få resultater).

4.2.4. Etanolfelling; oppkonsentreringsprosedyre.

Ved vurdering av hvor effektiv oppkonsentreringsprosedyren er, finner vi at C_t -verdiene for ikke oppkonsentrerte prøver ($n=6$) i tabell 9 er tilnærmet like resultatene etter oppkonsentrering. I henhold til teorien forventet vi at oppkonsentreringsprosedyren skulle gi lavere C_t -verdier, sammenlignet med prøver som ikke ble oppkonsentrert. En forklaring på dette kan være at cellekonsentrasjon er så høy ($1 * 10^6$) at oppkonsentreringsprosedyren ikke gir de ønskede forskjeller for C_t -verdier i CK 19 PCR. Når vi bruker den samme oppkonsentreringsprosedyren for prøver som i utgangspunktet ble tilsatt bare $1 * 10^3$ brystkreftceller, ser vi at oppkonsentreringsprosedyren gir lavere C_t -verdier for CK 19 etter etanolfellingen sammenlignet med C_t -verdier før etanolfellingen.

Oppkonsentreringsprosedyren gjør at prøver kommer opp 2-3,5 syklus tidligere (1 log faktor) sammenlignet med resultater uten oppkonsentrering. Selvom prøvene kommer opp

tidligere, dvs får lavere C_t -verdi for CK 19 og APRT, varierer oppkonsentreringseffekten fra prøve til prøve. Effektiviteten av oppkonsentreringsprosedyren er ikke konstant. Dette sees når man beregner differansen mellom C_t -verdien før oppkonsentrering og C_t -verdien etter oppkonsentrering.

Ved etanolfelling er det to trinn som gjør at man i løpet av prosedyren, kan miste cDNA molekyler. Det ene trinnet er ved avpipettering av supernatant etter sentrifugering, og det andre trinnet er ved lufttørring/varmetørring av produktet for å fjerne enhver rest av etanol. Med bakgrunn i våre resultater velger vi å ikke gjøre oppkonsentrering med etanolfelling.

4.3. Spikingforsøk, en vurdering av metodens sensitivitet.

Det har vært gjort spikingforsøk hvor ulike konsentrasjoner av brystkreftceller har blitt tilsatt prøver på 5 ml fra blodgivere. Som nevnt tidligere, har det vist seg å være vanskelig å få tatt ut en eksakt mengde celler til spikingforsøkene pga. cellenes tendens til adhesjon. Ved vurdering av analyser kjørt på ulike dager, viser det seg imidlertid at prøver som vært spiket med likt antall celler, men kjørt på ulike dager kommer opp rundt den samme C_t verdi for CK 19. Konferer spikingforsøk under resultater punkt 3.8, 3.9, 3.10 og 3.11. Prøver tilsatt $\sim 1 \cdot 10^4$ celler kommer opp med C_t verdier for CK 19 rundt 23-26. Parallele prøver spiket samme dag med $1 \cdot 10^4$ celler fra den samme celleduspensjon/fortynning viser mindre forskjeller enn variasjon oppgitt over. Det ene spikingforsøket gir for CK 19 C_t verdier fra 22,7-23,1. De to andre prøvene med $1 \cdot 10^4$ kreftceller som ble analysert en annen dag viser forskjell i C_t for CK 19 fra 25,9-26,6. Prøvene fra respektive dager viser også like C_t -verdier for APRT. For prøver tilsatt $1 \cdot 10^3$ MDA MB 468 kreftceller i fire ulike spikingforsøk viser C_t -verdier flg variasjon for CK 19 fra syklus 29,1-31,6. Det samme forholdet som for $1 \cdot 10^4$ celler gjelder også her. To og to prøver med lik konsentrasjon anrikt og analysert samme dag viser mindre variasjon i C_t -verdier.

For fire prøver tilsatt $1 \cdot 10^2$ MDA MB 468 celler som har blitt analysert på to forskjellige dager, viser C_t -verdier for CK 19 variasjon fra 33,7-36. Forskjellene som avdekkes kan

avspeile at det ved kjøring av analyser på ulike dager har vært tilsatt ulikt antall kreftceller som tidligere nevnt pga cellenes adherente egenskaper.

Spikingforsøk hvor 10 celler ble tilsatt 5 ml NPB viste mye mer varierende resultater mht til C_t verdi for CK 19. Teoretisk forventet vi at alle spikede prøvene med 10 celler skulle komme opp rundt den samme C_t verdien for CK 19. Det skjer ikke, og en mulig forklaring på dette kan være at det ikke har blitt tilsatt like mange celler til hver prøve med bakgrunn i at cellene kleber seg til hverandre. En prøve kommer forholdsvis tidlig opp, rundt $C_t = 34$ for CK 19, mens de 4 andre prøvene kommer opp med en C_t -verdi for CK 19 rundt 37-40. Prøvene uttrykker tilnærmet lik mengde APRT, som forteller at det er isolert like mye mRNA fra hver prøve. Prøve 3 har en høyere C_t verdi for APRT sammenlignet med de andre 4 prøvene. Det kan også fortelle at det har fulgt med noen flere hvite blodceller ved anrikningen sammelignet med de andre fire prøvene.

En annen forklaring på hvorfor resultatene varierer så mye, er at mengden celler eller transkripter man ender opp med etter anrikning, RNA-isolering og cDNA tillaging fra hver enkelt prøve er svært lav. Alle trinnene medfører sannsynligvis et tap av materiale(celler, RNA og cDNA) selvom det er vanskelig å tallfeste dette. Det brukes i tillegg bare en del av prøvematerialet i real time PCR reaksjonen. Dersom man teoretisk beregner at alle 10 celler tilsatt en prøve ble anrikt, vil det i 27 μ l totalt RNA være en cellekonsentrasjon på 10/27 μ l. Til cDNA tillaging benyttes 26,5 μ l. Total mengde cDNA er 50 μ l. Cellekonsentrasjon er nå på 0,19 celler/ μ l. Til hver PCR reaksjon tilsettes 2 μ l av cellekonsentrasjonen til 23 μ l mastermix. Dersom man regner på dette forteller det oss at det påvises transkripter fra ideelt sett 0,4 celler i PCR brønnen.

Et spørsmål som melder seg da, er hvor mange transkripter finnes i hver celle, og uttrykker brystkreftceller fra ulike personer ulik mengde RNA? Hvor mange kopier finnes av hvert enkelt mRNA molekyl i ei celle? Det er beskrevet at kreftceller er heterogene celler, og det kan tenkes at transkripsjonseffektiviteten varierer mht til hvilken fase kreftcellene befinner

seg i. Er det hvilende celler det er snakk om (G_0 -fase) eller er det aktiv celledeling. Man kan tenke seg at det er flere kopier i ei celle som er i aktiv celledeling sammenlignet med celler som er i hvilefase.

Ved vurdering av spikingforsøk ovenfor ser det ut som om prøver tilsatt $1 \cdot 10^2$ kreftceller av typen MDA MB 468 lar seg detektere. Dersom man går utfra at det i 5 ml NPB er rundt $1 \cdot 10^3$ hvite blodceller /ml, innebærer det at man kan påvise en kreftcelle i en bakgrunn på $5 \cdot 10^4$ hvite blodceller.

4.4. Analysering av blodprøver fra 12 kvinner med metastatisk brystkreftsykdom

For pasientprøve med id.nr 2, 7 og 12 blir C_t verdier for CK 19 lavere enn cut off som er satt til $C_t = 36$. For pasientprøve med id.nr 1, 6 og 8 faller en av parallellene for CK 19, dvs at den ene parallellen har C_t høyere enn 36, mens den andre parallelle verdien for CK 19 kommer opp rett før cut off verdi. Resterende prøver faller alle sammen utenfor den definerte cut off verdien. Ved beregning av antall kopier av transkriptene for de tre positive prøvene, finner vi at prøve 7 med den laveste C_t -verdien, dvs høyest konsentrasjon av brystkreft transkripter, har mellom 6-7 kopier CK19/ μ l. Prøve 3 har mellom 3 og 4 kopier CK19/ml mens prøve 2 har mellom 2-3 kopier CK19/ml.

Det ble tilsatt 4 μ l til PCR reaksjonen utfra totalvolum av cDNA på 50 μ l. Ved beregning for pasientprøve 7 skulle dette gi at det i cDNA teoretisk har vært 325 kopier CK 19. Hvor mange kreftceller dette korresponderer til er vanskelig å si noe om.

Dersom man beregner sensitivitet for metoden utfra disse 12 prøvene, finner vi at den gir en sensitivitet på bare 25 %. Men tallmaterialet er for lite til at dette kan gjøres statistiske beregninger utfra.

Med hensyn til pasientprøvene og påvisning av transkripter for EGF-R, var dette nedslående. Ingen av de 12 prøvene ble positive. C_t -verdier for prøvene er satt til syklus 40, dvs at det ved terminering av analysen ikke var detektert noen analyseprodukter.

Det er vist ved spiking forsøk med brystkreftcellelinjer ved avdelingen at EGF-R lar seg

påvise, og den klonede standarden har også vist at det kan detekteres inntil 10^1 kopier EGF-R.

Forklaringen kan ikke ligge i anrikningsprosedyre, RNA isolering eller cDNA tillaging siden vi har påvist transkripter for CK 19 og B2M (se senere). 3 av 12 prøver ble positive for CK 19, men C_t -verdier til CK 19 tilsier en lav konsentrasjon av CK 19 transkripter i prøvene. EGF-R analysen har ca en log faktor dårligere sensitivitet enn CK 19 analysen, og det kan forklare at de tre positive prøvene mht CK 19 er negative for påvisning av EGF-R transkripter. Resultatene fra spikingforsøkene viser at det er nødvendig å lage tre paralleller av hver prøve fordi det er galt å beregne gjennomsnitt C_t verdi av to prøver. Hvis en av to paralleller er positive, er det sannsynligvis en positiv prøve.

Resultater fra begge analysene kan tolkes dithen at det har vært små mengder av transkripter i form av sirkulerende brystkreftceller i blod.

For alle pasientprøvene ble det påvist B2M transkripter langt over den satte cut off ved $C_t = 36$. Dette betyr at RNA isoleringsprosedyren og cDNA-tillagingen har fungert godt. De 12 prøvenes C_t verdier for β_2M varierer fra 19,7 – 24,5.

De tre prøvene som ble positive mht CK 19, var ikke de tre prøvene som hadde lavest C_t verdi for β_2M , dvs høyest konsentrasjon av β_2M kopier. Korresponderende kopier β_2M for C_t verdier for β_2M viser seg å variere fra rundt $4 \cdot 10^3$ til $1 \cdot 10^5$ kopier / μ l for de 12 prøvene.

5. Oppsummering og konklusjon

Spikingforsøk som det er referert til over, viser at metodens sensitivitet for påvisning av CK 19 transkripter bare er 1 brystkreftcelle per $5 \cdot 10^5$ hvite blodceller. Dette er likt eller litt lavere enn beskrevet i andre publikasjoner hvor det ved bruk av RT-PCR er påvist 1 brystkreftcelle i en bakgrunn på $10^5 - 10^6$ (132). Spesifisiteten har imidlertid vist seg å være god i og med at de fleste nullprøver, dvs prøver fra blodgivere uten brystkreftceller, har blitt negative ved analysering for CK 19.

Ved analysering av pasientprøver fant vi at tre av tolv pasientprøver ble positive for transkripter av CK 19 mens alle prøvene ble negative for EGF-R transkripter. I alle prøver ble det påvist β_2 M transkripter langt over den satte cut off verdien.

Pasientprøvene er fra kvinner med metastatisk brystkreftsykdom, og man forventer at det skal være sirkulerende brystkreftceller i perifert blod. Resultatene bekrefter at metoden ikke er sensitiv nok. Resultatene kan også forklares utfra at brystkreftcellene ikke har uttrykt EpCam, som er det celleantigenet anrikningsprosedyren tar utgangspunkt i. Det er imidlertid beskrevet at EpCam molekylet har en forhøyet grad av ekspresjon i brystkreftceller.

Det arbeides ved avdelingen med å etablere en multiplex real time PCR hvor man kan detektere alle tre transkriptene i en og samme brønn. Dette innebærer at mindre prøvemateriale blir brukt for hver analyse, og analysen kan gjentas flere ganger eller det kan tilsettes større mengder cDNA til hver PCR reaksjon. Det siste kan tenkes å øke sensitiviteten.

Det er beskrevet i en artikkel av Mitas et al at transkriptene for mammaglobin (mam) og phosphoinositolphosphat (PIP) har høyest sensitivitet og spesifitet av brystkreftcelleassosierte gener, hhv 99,6 % og 93,3 %, og er de mest nøyaktige diagnostiske markører (29). Forfatterne i den samme publikasjonen plasserer CK 19 på tredje plass mht sensitivitet og spesifitet ved deteksjon av brystkreftassosierte gener (91,0 %).

Med bakgrunn i de negative resultatene for påvisning av EGF-R transkripter, må det

vurderes om det skal defineres nye måltargets.

Metoden har vært under videre utvikling ved avdelingen den senere tid og skal fremover utprøves ytterligere på flere pasientprøver. Man ser for seg at testen i fremtiden kan vise seg og være supplement til dagens diagnostikk.

Referanseliste

- 1:Kreftregisteret, <http://www.kreftregisteret.no/ramme.htm?start.shtm>.
- 2:"Blåboka" til Norsk Bryst Cancer Gruppe(NCBG),
<http://www.nbcg.net/default.asp?page=40>
- 3: **Kumar, Cotran og Robbins**; Basic Pathology, 6 th edition.Kpt 6 og 19.
- 4: **Thune og Smeland**; Kan fysisk aktivitet forebygge kreft.Tidsskr Nor Lægeforen 2000;
120: 3296-301.
- 5: **Klein, Blankenstein, Schmidt-Kittler, Petronio, Polzer, Stoecklein, Riethmuller**;
Genetic heterogeneity of single disseminated tumor cells in minimal residual cancer. The
Lancet, vol.360, august 31, 2002,683-688.
- 6: **Chamber, Groom, MacDonald**; Dissemination and Growth of cancercells in Metastatic
Sites. Nature, volume 2 , august 2002,563-572.
- 7: **Smalley and Ashworth**; Stem Cell and Breast Cancer: A Field In Transit.
www.nature.com/reviews/cancer. November 2003,volume 3.
- 8: **Ring, Smith, Dowsett**; Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. The Lancet Oncology,
vol. 5, februar 2004, side 79-88.
- 9: **Braun, Pantel, Muller, Janni el al**; Cytokeratin-positive cells in the Bone Marrow and
Survival of Patients with Stage 1, 2 og 3 Breast Cancer. New England Journal of Medicine,
vol. 342, no. 8, 24.februar 2000, side 525-533.
- 10:**Wiedswang, Borgen, Kåresen, Qvist, Janbu, Kvalheim, Nesland og Naume**: Isolated
Tumor Cells in Bow Three Years after Diagnosis in Disease-Free Breast Cancer Patients

Predict Unfavorable Clinical Outcome. *Clinical Cancer Research*, vol.10, 5.august 2004, side 5342-5348.

11: **Naume, Borgen, Tøssvik, Pavlak, Oates og Nesland**; Detection of Isolated Tumor Cells in Peripheral Blood in Bone Marrow: Evaluation of a New Enrichment Method. *Cytotherapy*, vol. 6, No.3, 2004, side 244-252.

12: **Shammas, Deak, Nysted, Van Eekelen, Osland og Heikkilää**; Serial Quantitative PCR Analysis of Bone Marrow Samples from Breast Cancer Patients to Monitor Systemic Micrometastases. *Anticancer Research*, 2001, 21: 2099-2106.

13: **Zhong, Kaul, Lin, Eichler and Bastert**; Sensitive Detection of Micrometastases in Bone Marrow from Patients with Breast Cancer Using Immunomagnetic Isolation of Tumor Cells in Combination with Reverse Transcriptase / Polymerase Chain Reaction for Cytokeratin 19. *Journal of cancer research, Clinical Oncology*, vol. 126, 2000, side 212-218.

14: **Ikeda, Miyoshi, Motomura, Inaji, Koyama og Noguchi**; Prognostic Significance of Occult Bone Marrow Micrometastases of Breast Cancer Detected by Quantitative Polymerase Chain Reaction for Cytokeratin 19 mRNA. *Japanese Journal of Cancer Research*, volume 91, september 2000, side 918-924.

15: **Slade, Smith, Sinnett, Cross, Coombes**; Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Detection of Micrometastases in Patients With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, vol.17, no. 3 1999, side 870-886.

16: **Muller, Pantel**; Bone Marrow Micrometastases and Circulating Tumor Cells: Current Aspects and Future Perspectives. *Breast Cancer Research*, vol. 6, no 6, 2004, side 258-260.

- 17: **Stathopoulou, Vlachonikolis, Mavroudis et al:** Molecular detection of CK-19 positive Cells in Peripheral Blood of Patients with Operable Breast Cancer; Evaluation of Their Prognostic Significance. *Journal of Clinical Oncology*, 2002;20:3404-3412.
- 18: **Weigelt, Bosma, Hart, Rodenhuis, van 't Veer;** Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2003 Apr 7; 88(7):1091-4.
- 19: **Christofanilli, Budd, Ellis, Stopeck, Matera, Miller et al:** Circulating Tumor Cells, Disease Progression and Survival in Metastatic Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, nr. 8, 2004, side 781-791.
- 20: **Osta, Chen, Mikhitarian, Mitas, Salem, Hannun, Cole, Gillanders:** EpCam Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Therapy. *Cancer Research*, vol.64,side 5818-24, 15.august 2004.
- 21: **Fellowes VS, Husebekk A, Gress R. E. et al.** Minimal residual disease detection in breast cancer: improved sensitivity using cytokeratin 19 and epidermal growth factor receptor RT-PCR. *Int J Oncol*. 2004 24(4):861-7
- 22: **Schoenfeld, Kruger, Gomm, Sinnett, Gazet, Sacks, Bender, Luqmani , Coombes:**The Detection of Micrometastases in Peripheral Blood and Bone Marrow of Patients With Breast Cancer Using Immunohistochemistry and Reverse Transcriptase Polymerase Chain reaction for Keratin 19. *European Journal of Cancer*, vol 33, no 6, side 854-61. 1997.
- 23: **Schmittgen, Zakrajsek, Mills, Gorn, Singer:** Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real Time Methods. *Analytical Biochemistry*, 285, 194-204, 2004.

- 24: **Datta et al.**, Sensitive Detection of Occult Breast Cancer by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *J Clin Oncol*,12,475-482, 1994.
- 25: **Schoenfeld, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, Shousha S, Sinnett HD, Coombes RC.** Detection of Breast Cancer Micrometastases in Axillary Lymph Nodes by Using Polymerase Chain Reaction.*Cancer Res* 54, 2886-2990, 1994.
- 26: **Ruud, Fodstad, Hovig.** Identification of a Novel Cytokeratin 19 Pseudogene That may Interfere With Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction Assays used to Detect Micrometastatic Tumor Cells. *International Journal of Cancer*, 80, 119-125.(1999)
- 27: **Luca, Pignata, Casamassimi, D'Antonio, Gridelli, Rossi, Cremona, Parisi, De Matteis, Normanno.**Detection of Circulating Tumor Cells in Carcinoma Patients by a Novel Epidermal growth Factor Receptor Reverse Transcription-PCR Assay. *Clinical cancer research*, vol.6, 1439-1444, 04-2000.
- 28: **Salomon et al.** Epidermal Growth Factor Related Peptides and Their Receptors in Human Malignancies. *Crit.Rev Oncol.Hematol*, 19:183-232, 1995.
- 29: **Mitas, Mikhitarian, Walters, Baron, Elliott, Brothers, Robison, Metcalf, Palesch, Zhang, Gillanders og Cole;** Quantitative Real Time RT-PCR Detection of Breast Cancer Micrometastasis Using a Multigene Marker Panel. *International Journal of Cancer*:93, 162-171.