

# **Påvisning av kreftceller i perifert blod hos pasienter med brystkreft**

**5.årsoppgave i Stadium IV – medisinstudiet  
Universitetet i Tromsø**

Skrevet av Stud.med. Kenneth Dørmænen, kull-98

Veileder: Anne Husebekk, Overlege dr. med. ved Avdeling for  
Immunologi og Transfusjonsmedisin

September 2003, Tromsø

# Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse	2
Sammendrag	3
Innledning	4
Målet for studien vår	4
Epidemiologi	4
Klassifisering	7
Risikofaktorer	8
Metastaser	10
Cytokeratin og carcinomer	11
Metoder til påvisning av brystkreftceller	11
Matriale og metode	12
PCR og RT-PCR	12
Real-time PCR	15
Prøvemateriale	16
Anrikning av brystkreftceller ved hjelp av Dynabeads® magnetiske kuler dekket med anti-Ber-EP4 antistoffer	16
Isolering av Total RNA vha Rneasy Mini kit®	18
CDNA-syntese vha SUPERScript II for RT-PCR	18
Oppkonsentrering av cDNA	18
Kvantitativ PCR av prøvene	19
Resultater	20
Diskusjon	22
Referanser	26

# Sammendrag

## *Innledning*

Sirkulerende kreftceller har vært påvist hos pasienter med små og store tumores i alle stadier av brystkreftsykdommen og er forbundet med dårligere prognose. Påvisning av sirkulerende brystkreftceller kan sees på som et tegn på minimal restsykdom (MRD) og kan brukes i terapeutiske og prognostiske overveielser hos den enkelte pasient. Målet med vår studie er å være med på å lage en sensitiv og spesifikk test for å oppdage brystkreftceller i perifert blod.

## *Materiale og metode*

15 ml ble tappet av pasienten etter at de fem første milliliterene ble kastet for å unngå forurensing av prøvene med epitelceller fra huden. Blodet ble anrikt for brystkreftceller med magnetiske kuler dekket med antistoffer (anti-Ber-EP4) med affinitet for EPCAM som er et epitelialt celleadhesjonsmolekyl. Total RNA ble isolert fra den anrikede cellefraksjonen og revers transkribert til cDNA. For å øke sensitiviteten ble cDNA oppkonsentrert, og brukt i kvantitativ PCR ved hjelp av TaqMan real time teknologi. Målet er å påvise og kvantitere mRNA via cDNA som koder for **CK 19 som er cancermarkør i våre forsøk**. Den kalkulerte sensitiviteten i 1 ml fullblod har vist seg å være 0,2-0,4 celler.

## *Resultater*

Vårt materiale inneholder for få pasienter til å trekke klare konklusjoner, men det ser ut som om det er en klar tendens til at mange pasienter med brystkreft har CK-19 positive celler i blodet. Av ti pasienter viste prøvene at åtte hadde CK-19 positive celler i blodet. Av fem presumptivt friske kontroller hadde kun én pasient et svakt positivt svar i en av to paralleller.

## *Diskusjon*

Testen må videreutvikles for å være god nok til rutinebruk i pasienter. Blant annet må man vurdere å brukes antistoff mot flere overflateantigen ved anrikning av brystkreftceller i fullblod, gjøre kvantitativ PCR på flere genprodukter enn CK-19 og bruke andre prøvetakingsrør for å stabiliserer mRNA i blodprøven. RT-PCR reaksjonen gir for stor variasjon . Det er også mye trolig at ulike cancerceller uttrykker ulik mengde EPCAM og mRNA for CK19. Testen bør ta høyde for slike variasjoner.

# **Innledning**

## **Målet for studien vår**

Deteksjon og kvantitering av brystkreftceller i perifert blod kunne ideelt sett gjøre det mulig å påvise mikrometastaser før kliniske symptomer på residiv. Sirkulerende kreftceller har vært påvist hos pasienter med små og store tumores i alle stadier av brystkreftsykdommen og er forbundet med dårligere prognose (1,2). Påvisning av sirkulerende brystkreftceller kan sees på som et tegn på minimal restsykdom (MRD) og kan brukes i terapeutiske og prognostiske overveielser hos den enkelte pasient. Vedvarende fravær av sirkulerende brystkreftceller kan tenkes å bety at helbredelse er oppnådd og at oppfølging kan avsluttes.

Tidligere har man vanligvis brukt immunhistokjemiske metoder for å påvise sirkulerende brystkreftceller (3). For å øke sensitiviteten av undersøkelsene har det vært gjort anrikning av brystkreftceller i blodprøven fra pasienten ved hjelp av antistoffer og magnetiske kuler (4,5). Brystkreftceller uttrykker antigener som vanligvis utelukkende uttrykkes på epitelceller, og i et cellemiljø der epitelceller vanligvis ikke finnes, er disse markørene regnet for å være tumorspesifikke.

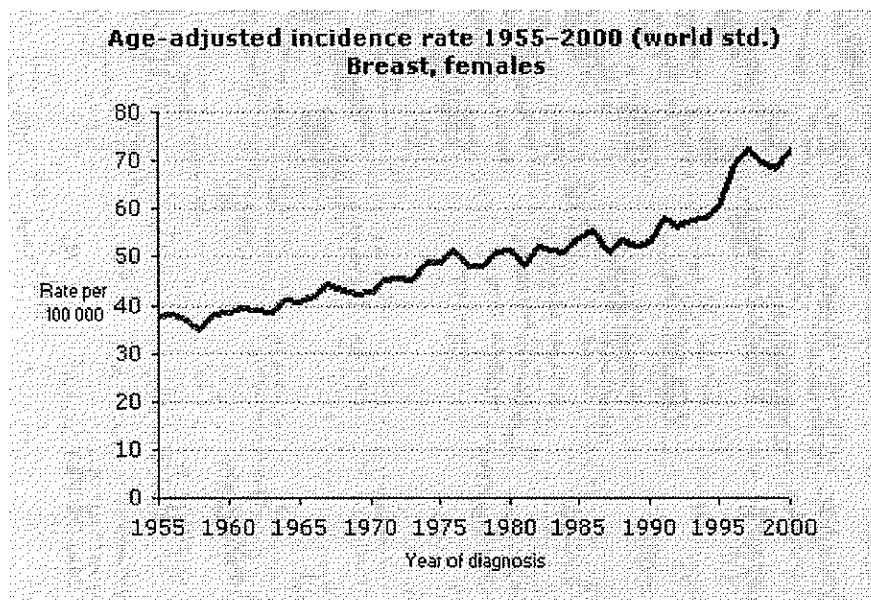
Det har også vært gjort forsøk på å påvise sirkulerende brystkreftceller ved hjelp av flowcytometri. En metode som ble publisert i 1998 viste å ha sensitivitet på 1 brystkreftcelle pr 5ml blod (6).

Målet med vår studie er å lage en sensitiv og spesifikk test for å oppdage brystkreftceller i perifert blod ved hjelp av kvantitativ PCR.

## **Epidemiologi**

I følge en studie av H. Wang et.al. publisert i British Journal of Cancer i 1998 ble 39,006 tilfeller av invasiv brystkreft registrert i Norge fra 1970 til 1993. Insidensratene steg i alle aldersgrupper i denne perioden (8). Figur 1 viser stigningen fra 1955 frem til 2000 som rate per 100,000. Den aldersjusterte insidensraten økte fra 62,0 pr.100,000 personår i 1970-1974

til 76,9 per 100,000 personår i 1990-1993. Den årlige stigningen lå på 1,0%. Økningen ser ut til å være størst i aldersgruppen under 40 år. Stigningen utgjøres i hovedsak av brystkreft diagnostisert i Stadium 1 (T1N0M0) på diagnosetidspunktet (8).



*Figur 1: Viser økningen i insidensen av brystkreft i Norge fra 1955 til 2000. Kilde: [www.Kreftregisteret.no](http://www.Kreftregisteret.no)*

Mortalitetsraten var ganske stabil i denne perioden og den aldersjusterte mortalitetsraten var 26,4 per 100 000 personår i perioden 1990-1993. Det var en årlig stigning på 0,5%.

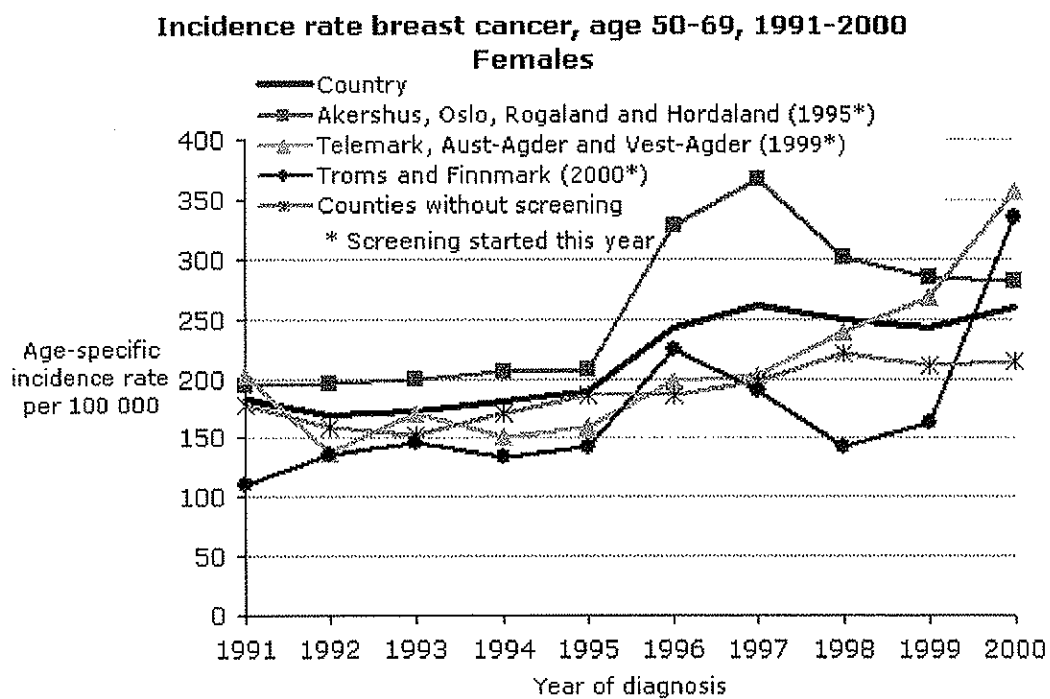
Insidensen økte altså signifikant mer enn mortaliteten. Stadium ved diagnosetidspunktet er å anse som den viktigste prognostiske faktor. Overlevelsesraten for pasienter med brystkreft i stadium 2 har økt i perioden for alle aldersgrupper. For de andre stadiene ser man bare små forbedringer.

5-års overlevelsen har økt blant pasienter med axillære lymfeknutemetastaser på diagnosetidspunktet. Ved de andre stadiene vises kun en liten forbedring (8).

Mammografiscreening kom i gang i Norge i løpet av 1990-tallet. Fylkene Akershus, Oslo, Rogaland og Hordaland begynte i 1995. Telemark og Agderfylkene kom etter i 1999.

Finnmark og Troms startet i år 2000. Figur 2 som viser insidensraten pr.100 000 fra 1991-2000 viser at de fylkene som har startet med mammografiscreening, har fått en merkbar økning i insidensraten. Samtidig falt andelen av de nydiagnostiserte med axillære lymfeknutemetasaser fra 80% til 60% (9). Man klarte altså å få tak i flere brystkrefttilfeller på et tidligere tidspunkt i sykdomsutviklingen.

Som en følge av mammografiscreeningen økte også den totale insidensraten av brystkreft i Norge (se Figur 2).



*Figur 2: Figuren viser hvordan insidensen av brystkreft har endret seg i de ulike fylkene etter innføringen av mammografiscreening. Kilde: [www.Kreftforeningen.no](http://www.Kreftforeningen.no)*



## Klassifisering

<b>Primærtumor (T)</b>
TX Primærtumor mistenkes, men kan ikke vises
T0 Ingen tydelig primærtumor (klinisk okkult)
Tis Carcinoma in situ: inkluderer både ductal og lobulær carcinoma in situ, Paget's disease of the nipple uten invasjon og uten tumor.
T1 Tumor mindre enn 2,0 cm i største diameter
T1 mic Mikroinvasjon tilstede, 0,1 cm eller mindre i største diameter
T1a Tumor større enn 0,1 cm, men ikke mer enn 0,5 cm i største diameter
T1b Tumor større enn 0,5 cm, men ikke mer enn 1,0 cm i største diameter
T1c Tumor større enn 1,0 cm men ikke mer enn 2,0 cm i største diameter
T2 Tumor større enn 2 cm, men ikke større enn 5 cm i største diameter
T3 Tumor større enn 5 cm i største diameter
T4 Tumor uansett størrelse med innvekst til brystvegg eller hud, som beskrevet under
T4a Innvekst til brystvegg
T4b Ødem eller ulcerering av brystets hud eller forekomst av satellittnoduler i samme bryst
T4c Både T4a og T4b
T4d Inflammatorisk carcinom
<b>Regionale lymfeknuter (N)</b>
NX Regionale lymfeknutemetastaser mistenkes, men kan ikke vises (eller fjernet forut)
N0 Ingen regionale lymfeknutemetastaser
N1 Metastaser til ipsilaterale axillære lymfeknuter som kan fjernes
N2 Metastaser til ipsilaterale axillære lymfeknuter fiksert til hverandre eller til andre strukturer
N3 Metastaser til ipsilaterale interne lymfeknuter i brystet
<b>Fjernmetastaser (M)</b>
MX Fjernmetastaser mistenkes, men kan ikke vises
M0 Ingen tydelige fjernmetastaser
M1 Fjernmetastaser (inkludert metastaser til ipsilaterale supraclaviculære lymfeknuter)

Tabell 1: Viser TNM-klasifikasjonen av mammaecancer. Klassifisering av brystkreft er viktig for å predikere prognose, valg av behandling og sammenligne effekten av ulike behandlinger.

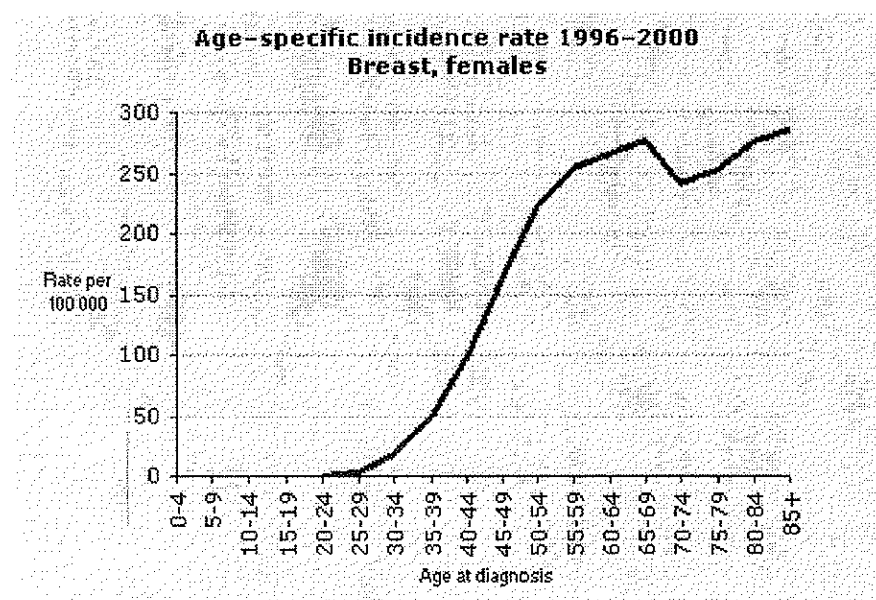
## Risikofaktorer

### Kjønn

At menn også kan få brystkreft er noe som ofte glemmes, men insidensen er 100 ganger høyere hos kvinner (10).

### Alder

Insidensen øker med alderen. Sykdommen er sjelden i tenårene og stiger kraftig til 40 års alderen. Fra og med menopausealderen flater insidensraten ut (10). Figur 3 og Tabell 2 viser denne tendensen tydelig.



Figur 3: Figuren viser aldersspesifikk insidensrate for brystkreft i perioden 1996-2000. Kilde: [www.kreftregisteret.no](http://www.kreftregisteret.no).

Alder	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
0-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10-19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
20-29	11	8	14	15	15	5	4	9	5	7	13
30-39	91	111	107	134	99	110	105	110	102	95	118
40-49	322	345	354	373	370	395	407	400	373	385	407
50-59	264	308	287	307	386	358	512	599	608	652	657
60-69	370	421	386	377	343	418	505	524	483	431	526
70-79	471	474	488	463	485	474	468	445	470	477	429
80-89	282	278	297	248	273	295	292	286	306	295	291
90-	48	36	38	35	48	61	61	47	58	55	65
Sum:	1861	1981	1971	1952	2019	2117	2354	2420	2405	2397	2506

Tabell 2: Viser insidensratene mot alder i tiårsintervaller. Tallene er hentet fra Kreftregisteret.



### *Tidligere brystkreft*

Utvikling av ny brystkreft hos kvinner som har hatt brystkreft tidligere, kan skyldes at den første kreften hadde flere utgangspunkt eller at den ikke ble tilstrekkelig behandlet. Det kan også være at det er en helt ny kreftutvikling. Det er vist at hos en pasient som har hatt brystkreft, vil den relative risikoen for å utvikle ny brystkreft 20 år etter den første diagnosen være 1,2 til 1,5. Risikoen synes å være størst hvis den første diagnosen ble stilt før 40-årsalderen (10).

### *Familiehistorie og genetisk predisposisjon*

Man regner med at omtrent 5-10% av alle brystkrefttilfeller er relatert til arvelige genmutasjoner. Pasienter med Li-Fraumeni syndromet har en generell økt tendens til carcinomutvikling. Dette syndromet er årsaken til ca. 1% av brystkrefttilfellene. Mutasjonen sitter på tumor suppressor genet p53. Brystkreft som skyldes dette syndromet, debuterer ofte før 40-årsalderen og er oftere bilateral enn brystkreft med annen patogenese (10).

Et annet gen som krever mer oppmerksomhet, er tumor suppressor genet BRCA-1. Man regner med at germ line mutasjoner i dette genet er årsaken til majoriteten av arvelige årsaker til både bryst- og ovariecancere. Man regner med at med mutasjoner i dette genet, har kvinner 50% sjanse for å utvikle brystkreft før 50-årsalderen og 80% før fylte 65 år (11).

Mutasjoner i tumor suppressor genet BRCA-2 er årsak til ca. 10-15% av arvelige brystkrefttilfeller (10).

### *Endokrine faktorer*

Langvarig påvirkning av endogene østrogenes synes å gi en klar risikoøkning for brystkreft og inkluderer faktorer som tidlig menarke, sen menopause, nulliparitet og færre måneder med laktasjon. Kvinnene utsettes for langvarig østrogenpåvirkning i forbindelse med østrogentoppene i menstrasjonssyklusene (10).

Påvirkning av eksogene østrogenes som ved bruk av P-piller og østrogenbehandling av etter menopause, synes også å øke risikoen for brystkreft. Studier har vist at mens man tar p-piller er den relative risikoen 1,24. Ti år etter avslutning med p-piller har relativ risiko sunket til 1,01. Når det gjelder østrogen erstatningsterapi er den relative risiko 1,3 etter 10 års bruk (10).

### *Benign proliferativ brystsykdom*

Atypi med uttalt hyperplasi utgjør en signifikant risikofaktor, og da særlig blant kvinner med en familiehistorie med brystkreft (10).

### *Stråling*

Kvinner som har blitt utsatt for stråling som ved multiple røntgen thorax ved vurdering av for eksempel tuberkulose, viser seg også å ha økt risiko for brystkreftutvikling. Den økte risikoen blir tydelig først etter 10-15 års latenstid. Den økte risikoen er mest tydelig hvis eksponeringen skjer før 35-års alderen og er mindre tydelig ved eksponering etter 40-års alderen (10).

### *Andre risikofaktorer*

Det har også blitt satt frem teorier om at usunn livsstil med mye fett i maten, overvekt, alkohol og røyking øker muligheten for brystkreft uten at man har klart å føre klare bevis for det (10).

## **Metastaser**

Spredning av brystkreft skjer lymfogent eller hematogent. Sykdommen har spredd seg til lymfeknuter i to tredjedeler av tilfellene på diagnosetidspunktet. Primærtumorene som er lokalisert sentralt og i de ytre kvadrantene, sprer seg vanligvis først til de axillære lymfeknutene. De som er lokalisert i de indre kvadrantene sprer seg vanligvis først til mediastinære lymfeknuter i brystet. Tumoren kan også spre seg til supraclavikulære lymfeknuter, men da er som oftest de axillære og/eller de mammilære lymfeknutene allerede involvert.

Videre følger eventuelt fjernmetastaser som kan finnes i omtrent alt av vev og organer i kroppen, men spesielt er lunge, skjellett, lever og binyre utsatt for metastasering av brystkreft. Mer sjeldent kan man se metastasering i hjernen, milten og hypofysen. Det er viktig å huske på at metastaser kan opptre inntil 15 år etter at man tilsynelatende har kurert den primære sykdommen (11).

I de senere år har man blitt mer og mer fokusert på mikrometastaser av brystkreft i beinmargen. Man har blitt klar over at over en tredjedel av alle pasientene som har cancer i tidlige stadier har slike mikrometastaser.

## **Cytokeratin og carcinomer**

Cytokeratin er et protein i gruppen keratiner, som er en del av intermediaerfilamentene. Keratin finnes i all hovedsak i epitel. Keratin er ofte assosiert med desmosomer og hemidesmosomer, strukturer som danner celle-celle og celle-matrix kontakter. På denne måten bidrar keratinet til at epitelet kan stå i mot fysisk stress (13).

Oppbygningen av intermediaerfilamentene er i korte trekk coilede dimerer av aminosyreskjeder som danner et protofilament. Som oftest består et intermediaerfilament av åtte protofilamenter i lange kjeder. Tykkelsen på et intermediaerfilament er 10 nm.

Hovedoppgaven til disse filamentene er å skape strukturell støtte til cella og å være med på å bygge opp cytoskjelettet. Kraften i disse filamentene, er med på å beskytte cella mot skade ved stress og strekk (12).

Keratin kan deles inn i to grupper. I en gruppe finnes omtrent 10 keratintyper som er spesifikke for keratinisert vev som hår og negler. Den andre gruppen er cytokeratinene som det finnes ca. 20 ulike av. Cytokeratinene finnes i epitel som dekker kroppens hulrom (13). Epitelceller finnes vanligvis ikke i blodet. Funn av cytokeratin 19 (CK19) genuttrykk i celler isolert fra blodet, kan skyldes kontaminasjon av epitelceller i forbindelse med blodprøvetaking eller genuttrykk fra carcinomceller i perifert blod (def carcinom: epitelderiverte tumorer, eksempelvis bryst, prostata etc.). I vårt forsøk hadde pasientene diagnostisert carcinom i brystet, så det er nærliggende å tro at eventuelle positive svar skyldes brystkreftceller som sirkulerer i blodbanen..

## **Metoder til påvisning av brystkreftceller**

Det er i hovedsak tre metoder som har blitt brukt i ulike forsøk på å detektere brystkreftceller: immunohistokjemi, flowcytometri og PCR. Her beskrives flowcytometri og immunohistokjemi kort, mens PCR-metoden utdypes mer da det er metoden vi brukte.

### **Immunohistokjemi**

Immunohistokjemi går også ut på at man tilsetter antistoffer til celleduspensjonen visualiserer celler med antistoff på overflaten, i lys- eller elektronmikroskop. Antistoffene

binder sitt antigen og markerer dermed strukturene man er ute etter. Mikroskoperingen kan nå automatiseres (15).

### **Flowcytometri**

Flowcytometri går i korte trekk ut på at man tilsetter antistoff med fluorescerende fargestoff til en celleblanding. Antistoffene kan binde til overflatemolekyler som bare finnes på den cellypen vi er ute etter. Celleblandingen utsettes for laser lys når cellene passerer gjennom flowcellen i et flowcytometer. Det blir dermed mulig å identifisere cellene som har bundet til seg antistoffer med fluorescerende stoff. Hvis cellene sorteres i flowcytometeret kan cellene dyrkes i en cellekultur (13,14).

### **PCR**

Ved RT-PCR amplifiseres det genet som detekteres i et stort antall kopier. RT-PCR har vist seg å være mer sensitiv enn immunhistokjemiske metoder til påvisning av CK-19 positive celler (16).

**Målet med studien vår er å være med på å lage en sensitiv og spesifikk test for å oppdage brystkreftceller i perifert blod.**

## **Materiale og metode**

### **PCR og RT-PCR**

PCR er en in-vitro metode for å amplifisere en gitt DNA/RNA-sekvens. Man trenger ett par primere (oligonukleotider) som er komplementær til endene av DNA-trådene vi er interessert i å amplifisere.

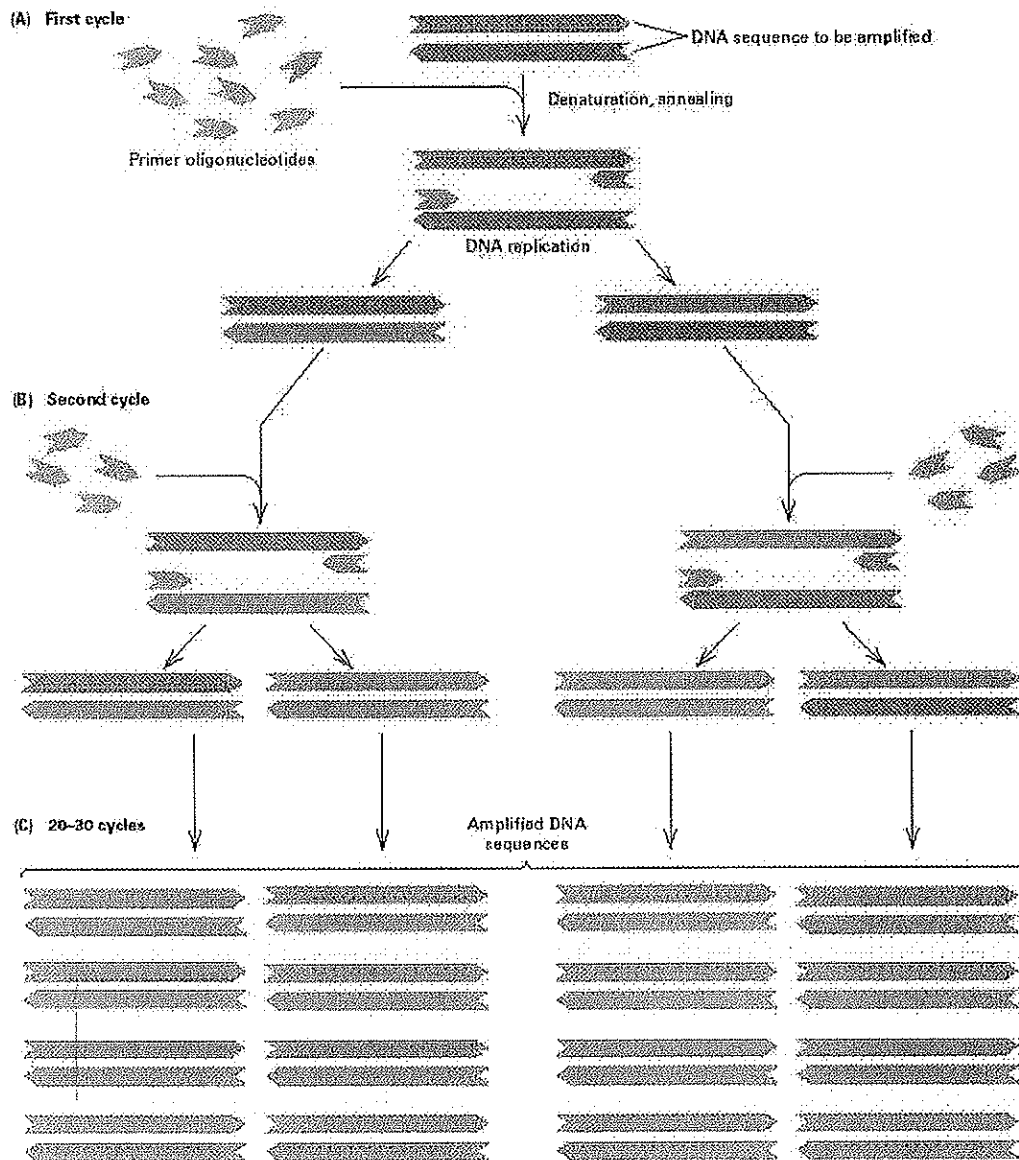
Selve PCR-prosessen starter med at man varmer opp DNA for å skille (denaturere) de to trådene. Så avkjøler man og tilsetter primere som er små definerte gensekvenser som representerer flankene til den genbiten som skal amplifiseres. Videre tilsetter man de fire ulike nukleotidene som byggesteiner for nye DNA tråder og varmestabil DNA-polymerase

som katalysator i reaksjonen. DNA-polymerasen sammen med nukleotidene vil bygge opp komplementære DNA sekvenser til de to adskilte DNA-trådene og resultatet er at vi sitter med to dobbelt-trådede DNA. Så gjentar man prosessen og resultatet blir fire komplette DNA-sekvenser. For hver amplifiseringsrunde fordobles antall kopier og man får en eksponentiell stigning i antall kopier når man øker antall sykluser.

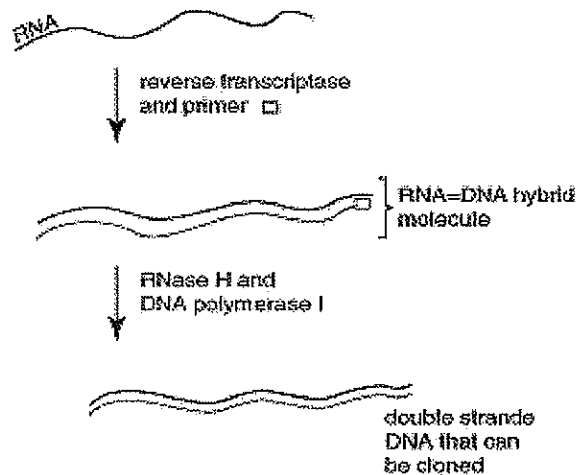
Dette er en noe forenklet måte å forklare PCR reaksjonen på men prinsippet følger altså cellenes vanlige måte å doble DNA-sekvenser på. Effektiviteten i reaksjonen kommer an på valg av primersekvens, riktig mengde nukleotider i blandinga, optimal temperatur, pH, kalium- og magnesiumkonsentrasjon (17). Magnesiumkonsentrasjonen påvirker enzymaktiviteten, og ubalansert nukleotidforhold reduserer polymerasens nøyaktighet (18). Når det gjelder primerne så er det viktig at de ikke er for korte da det er en økt sjans for at de kan binde seg til flere steder på DNA-tråden. Man sier at en primerlengde på 18 nukleotider er stort nok til at primeren skal kun finne én bindingsplass. Primeren må heller ikke være for lang da det vil sette ned hastigheten på hybridiseringen. I vanlige PCR-reaksjoner blir ikke primerne designet til å være lengre enn 30 nukleotider. Figur 4 er en forenklet skisse som viser prinsippene i PCR-reaksjonen og den eksponentielle økningen i mengde av PCR-produkt.

Hvis målet for PCR reaksjonen er et transkribert gen brukes mRNA i form av cDNA som templat. mRNA kan imidlertid ikke direkte amplifiseres. Derfor må mRNAet først bli kopiert til en komplementær DNA sekvens (cDNA) ved hjelp av revers transkriptase (RT). Dette cDNA-fragmentet kan man så amplifisere i en PCR-reaksjon (RT-PCR). I vårt forsøk brukte vi en mutert revers transkriptase fra et virus kalt Moloney murine leukemia virus (MMLV). Denne revers transkriptasen kalles SuperScript II. Figur 5 skisserer trinnene i revers transkripteringsprosessen.

Etter PCR blir vanligvis amplifikasjonsproduktet analysert ved hjelp av gelelektroforese (19,20).



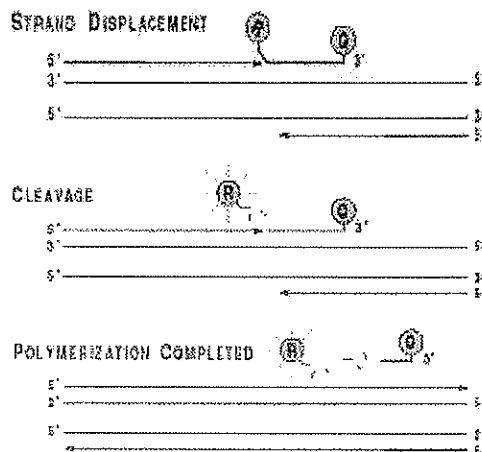
*Figur 4: Figuren viser prinsippene for PCR-reaksjonen og den eksponentielle stigningen i mengden av PCR-produkt.*



Figur 5: Figuren viser de trinnene i revers transkripsjonsprosessen.

## Real-time PCR

Real-time PCR er en kvantitativ PCR-metode. Det er basert på bruk av en fluorescerende probe som er designet til å hybridisere til gen-sekvensen mellom de to PCR-primere. Proben inneholder et fluorescerende fargestoff (reporter) på 5'-enden og et stoff som motvirker effekten av reporteren (quencher) på 3'-enden. I den intakte proben skjer det ingen emisjon av lys fra reporteren da quencheren vil motvirke dennes virkning. Tac polymerase vil imidlertid kløyve proben slik at quencheren ikke vil kunne hindre reporteren i å emitere lys. Figur 6 viser denne prosessen skjematisk.

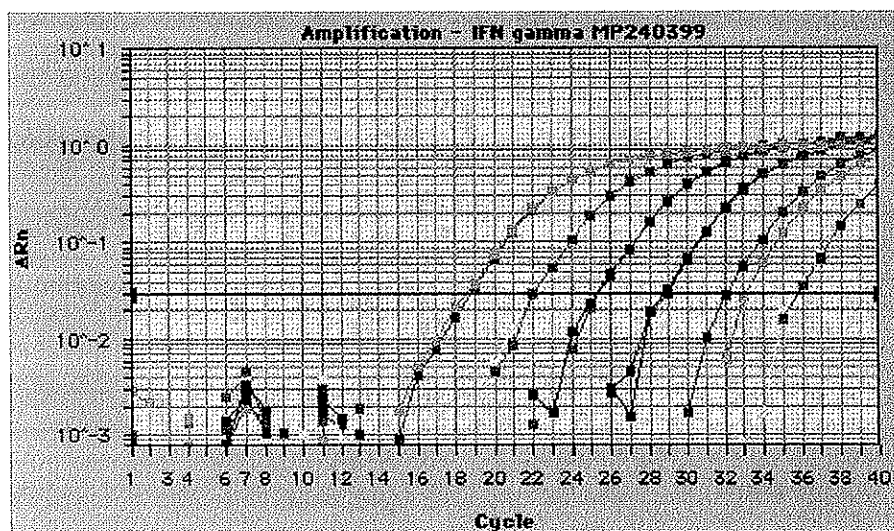


Figur 6: Figuren viser hvordan Reporteren (R) emitterer lys straks den "kattes" av proben og Quencher (Q) i polymeriseringsprosessen. Se tekst for utfyllende forklaring.



Mengden av probe som kløyves, er proporsjonal med mengden PCR-produkt som lages. På denne måten vil mengden av fluorescens øke med mengden PCR-produkt som lages. Fluorescensen detekteres automatisk av ABI Prism 7700 (PE Biosystems) som er PCR-maskinen, vi kjørte våre prøver i (19).

Real-time PCR metoden bestemmer **terskelverdien (Ct)** som representerer den PCR-syklusen der fluorescensen har økt så mye at det overstiger et definert basisnivå. I våre forsøk kjørte vi 44 sykluser. Ct verdiene sammenliknes med en standardkurve for cDNA isolert fra et kjent antall dyrkede kreftceller. Figur 7 viser hvordan grafene kan bli seende ut på ABI Prism 7700 (kurven gjelder amplifikasjon av INF gamma og representerer et annet genuttrykk enn vi har undersøkt . Avtanden mellom hver dobbelkurve representerer en log faktor cDNA.)



*Figur 7: Figuren viser et eksempel på hvordan grafene kan bli seende ut på ABI Prism 7700 etter en kvantitativ PCR kjøring. Den uthevede horisontale linjen er Ct-verdien.*

I tillegg til å amplifisere CK-19 cDNA, ble APRT cDNA (housekeeping gen) amplifisert. Dette gjøres for å sjekke kvaliteten på PCR-reaksjonen fra prøve til prøve og kvaliteten på cDNA-syntesen (19).

## **Prøvemateriale**

Prøvematerialet besto av 15 ml blod (først ble 5 ml blod kastet for å unngå epitelcellekontaminering) som ble tappet fra 10 pasienter som går til behandling for brystkreft ved kreftavdelingen ved Universitetssykehuset i Nord-Norge. I tillegg ble det tatt prøver fra 5 presumptivt friske personer som kontroll.

## **Anrikning av brystcancer celler ved hjelp av Dynabeads® magnetiske kuler dekket med anti-Ber-EP4 antistoffer**

De magnetiske kulene, Dynabeads, er dekket med IgG1 fra mus og er spesifikk for to glykopeptidmembranantigener uttrykt på de fleste normale epitelceller og epitelderiverte kreftceller (carcinomer).

For å fjerne løst antistoff og oppbevaringsmedium, vaskes kulene før bruk. Først ristet man glasset med kuler for å blande løsningen. Så pipeterte man 375  $\mu$ l magnetiske kuler (for 15 ml blod) til et Eppendorfrør. Videre ble Eppendorfrøret plassert på en magnet for å skille ut kulene og pipeterte vekk væsken slik at kulene ble igjen. For å vaske kulene tok man Eppendorfrøret vekk fra magneten, tilsatte 2 ml vaskebuffer (PBS, 0,1% BSA), blandet kulene i væsken og plasserte det på magneten igjen. Så fjernet man væsken igjen og beholdt kulene. Denne vaskingen ble gjentatt to ganger til, og til slutt ble kulene blandet i 375  $\mu$ l vaskebuffer.

### **Positiv seleksjon av brystcancer celler fra fullblod**

En tilsatte de vaskede kulene (375  $\mu$ l) til 15 ml EDTA antikoagulert fullblod, og lot denne mixen blandes på maskin i kjøleskap (2-8°C) i 30 min. Videre ble glasset plassert på en magnet (plassert på is) i 8 min. (snudde glasset en gang etter 4 min. for å få med kuler/celler fra lokket). Så ble supernatanten kastet og kulene skylt forsiktig med 4 ml vaskebuffer. Videre fjernet man glasset fra magneten, tilsatte 4 ml vaskebuffer, blandet kulene og satte glasset på magneten igjen. Den sto der i fem minutter. Man kastet supernatanten og blandet cellene i 1 ml vaskebuffer.

## **Isolering av Total RNA vha Rneasy Mini kit®**

Cellene ble sentrifugert ved 9000 rpm i 2 min. og supernatanten ble kastet. Til bunnfallet tilsatte en 350 µl Buffer RLT (Qiagen, Rneasy mini kit, Valencia, USA ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com))) tilsatt B-Mercaptoetanol. Så ble blandingen vortexet godt for å knuse cellene. Så ble prøven plassert på en magnet i 3 min. Videre pipeterte man supernatanten over i en ny Eppendorftube, tilsatte 350µl 70% etanol og blandet løsningen godt vha pipetering. Så ble blandingen (700 µl) overført i en Rneasy mini spin kolonne (som sitter i en 2 ml collectiontube) som medfølger i kitet, og sentrifugert i 15 sekunder ved 13 000 rpm. Væsken som gikk gjennom, ble kastet. Videre tilsatte man 350 µl RW1 buffer oppå kolonnen og sentrifugerte i 15 sekunder ved 13 000 rpm. Så tilsatte en 80 µl Dnase oppå kolonnen og lot det stå i romtemperatur i 15 minutter. Videre ble 350 µl Buffer RW1 tilsatt oppå kolonnen og sentrifugert i 15 sekunder ved 13,000 rpm. For å vaske videre tilsatte man 500 µl Buffer RPE (følger med i kittet), tilblandet etanol på kolonnen og sentrifugerte ved 13,000 rpm. Dette ble gjort to ganger; første gang 15 sekunder i sentrifugen, og andre gang i 2 minutter. Så overførte man Rneasy spin kolonnen til en 1,5 ml Eppendorftube, tilsatte 27,5 µl Rnase-fritt vann direkte på Rneasy-membranen og sentrifugerte i 1 minutt ved 13 000 rpm for å eluere prøven over i Eppendorfrøret.

## **cDNA-syntese vha SUPERSCRIPT II for RT-PCR**

Prøven ble overført fra Eppendorfrøret til en 0,2 ml Micro Tube som en kunne bruke i PCR-maskinen, tilsatt 2,5 µl Primer poly T og 2,5 µl dNTP og inkubert ved 65°C i 5 min. Så tilsatte en 5 µl DTT, 10µl RT buffer og 1 µl Ribonuklease inhibitor til prøven, og inkuberte ved 42°C i 2 minutter. Til slutt tilsatte man 2,5 µl Superscript II (revers transkriptase) og inkuberte ved 42°C i 50 min og inaktiverte revers transkriptasen straks etterpå ved å heve temperaturen til 70°C i 15 min.

Det ble hele tiden jobbet på is for å holde RNA mest mulig stabilt under cDNA-syntesen.

## **Oppkonsentrering av cDNA**

Før prøvene ble analysert vha TaqMan real time PCR, ble cDNA oppkonsentrert. Først tilsatte man 5 µl NatriumAcetat ( 3M, pH=4,6) og 150 µl 100% Etanol, vortexet blandingen

godt og sentrifugerte ved 13 000 rpm i 15 min. Så ble pelleten vasket med 300 µl 70% etanol, sentrifugert ved 13 000 rpm i 3 minutter, supernatanten kastet og pelleten lufttørket. Til slutt ble den tørre prøven slemmet opp i 17 µl destillert vann.

## **Kvantitativ PCR av prøvene**

Mastermixen til PCR-reaksjonen besto av nukleotider (dATP, dGTP, dCTP, dUTP), MgCl<sub>2</sub>, 10X TMBA bufferløsning, CK-19 probe (CGG CCT CCA CGC TCA TGC), CK-19 5' (forward) primer (AAC CAA GTT TGA GAC GGA A) og 3' (reverse) (TGC GCA GGC CGT TGA). Blandingsforholdet ble bestemt etter skjema. Enzymene Taq polymerase (AmpliTaq Gold) og Urasil N-Glykosylase (UNG) ble så tilsatt og til slutt cDNA prøvematerialet.

PCR reaksjon ble kjørt i fire faser: 1: 50°C i 2 minutter.

2: 95°C i 10 minutter.

3: 95°C i 15 sekunder.

60°C i 1 minutt.

Fase 3 repeteres 6 ganger.

4: 95°C i 15 sekunder.

56°C i 1 minutt.

Fase 4 repeteres 44 ganger.

Det er syklusene i fase 4 det refereres til når vi skal bestemme terskelverdien (se under).

Real-time PCR-metoden bestemmer **terskelverdien (Ct)** som representerer den PCR-syklusen der fluorescensen har økt så mye at det overstiger et basisnivå og fanges opp av ABI Prism 7700. Det er denne terskelverdien som presenteres under resultatene.

## Resultater

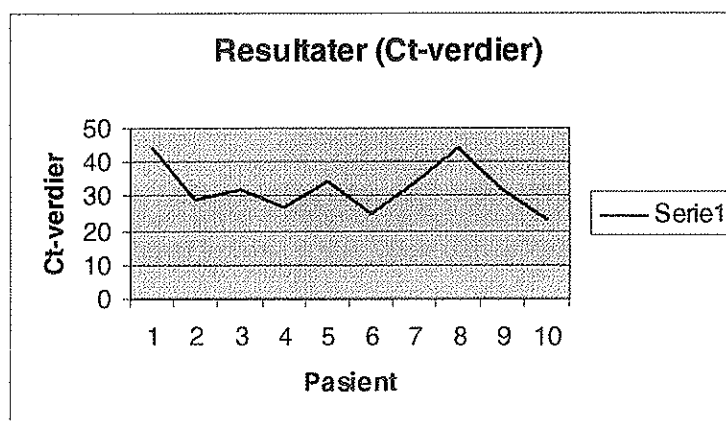
*Tabell 3: I dette materialet er det 10 pasienter, alle med metastatisk brystkreftdiagnose. Tallene er Ct verdier (terskelverdier) for de ulike pasientene. Ct-verdier på 44 tilsvarer en negativ prøve. Gjennomsnittsverdier er ikke regnet ut her.*

Pasient	1.parallell (Ct)	2.parallell (Ct)	Gjennomsnitt (Ct)
1	44	44	
2	29,17	28,56	28,86
3	31,61	32,43	32,02
4	26,58	27,05	26,81
5	34,38	33,83	34,10
6	24,77	24,65	24,71
7	29,74	37,88	33,81
8	44	44	
9	31,82	32,35	32,08
10	23,39	23,55	23,47

*Tabell 4: I tillegg analyserte vi blodprøver fra fem presumtivt friske personer. Tallene er Ct-verdier. Ct-verdier på 44 tilsvarer en negativ prøve.*

Pasient	1.parallell (Ct)	2.parallell (Ct)
11	44	39,08
12	44	44
13	44	44
14	44	44
15	44	44

Resultatene er som beskrevet i Tabell 3 for pasienter med påvist metastaserende brystkreft. Det ble kjørt to paralleller av hver prøve for å få en mer nøyaktig middelerdi. Se også linjediagram i Figur 8.



*Figur 8: Resultater som Ct-verdier i linjediagram. Merk pasient 1 og 8 som kommer ut med 44 i Ct-verdi, altså negativ prøve.*

Resultatene for de presumptivt friske, er presentert i Tabell 4. Ct-verdier på 44 regnes som negative prøver.

Når det gjelder prøvene fra de 10 pasientene med brystkreft ser vi at Ct-verdiene svinger mellom 23,39 og 44 sykluser. Vi ser at hos to pasienter, nr 1 og 8, får vi Ct-verdier på 44, altså ingen utslag og ingen cDNA-syntese.

Ser vi bort fra pasient 1 og 8 varierer gjennomsnitts Ct-verdiene mellom 23,47 og 34,10 med snitt på 29,48.

Når det gjelder variasjonen mellom de to parallellene ser vi at den er liten for alle pasientene, bortsett fra hos pasient 7 som har en variasjon på 8,14. Ellers ligger forskjellen mellom 0 og 0,82.

For de friske individene ser vi at det kun er nummer 11 som har et svakt utslag (39,08) på den ene parallellen.

Tabell 5 på neste side viser noen pasientdata på pasientene vi tok prøvene fra.

Pasient	Alder på diagnosetids-Punkt	TNM-status ved diagnosetids-punkt	Tid fra første metastase til CK-19 analyse (mnd)	Behandling ved tidspunkt for CK-19 analyse	Sykdoms-aktivitet ved tidspunkt for CK-19 analyse
1	54	T2N1M0	12	Strålebehandling og Tamoxifen	Hjerne- og skjellettmetastaser
2	37	T1N1M0	1	Strålebehandling FEC(cytostatika) og Tamoxifen	Skjellettmetastaser
3	47	*	184	Strålebehandling og Tamoxifen	Skjellettmetastaser
4	58	T2N0M0	58	Adriamycin og Megace	Levermetastaser
5	39	T1N0M0	26	Femar	Lunge-, Lever- og Skjellettmetastaser
6	65	T2N1M0	1	Strålebehandling og Nolvadex	Levermetastaser
7	34	T2N1M0	38	Tamoxifen og Zoladex	Levermetastaser
8	39	TXN1M0	14	Taxol	Lever- og skjellettmetastaser
9	35	*	21	Tamoxifen, Aromacin, Femar og FEC	Lungemetastaser
10	64	*	2	Strålebehandling	Skjellettmetastaser

*Tabell 5. Tabellen viser en del data som beskrevet over på pasienter vi tok prøver fra til analysering. (\* - Data ikke tilgjengelig).*

## Diskusjon

Når vi ser på resultatene til pasient 1 og 8 som har fått Ct-verdier på 44, altså ingen utslag og ingen cDNA-syntese, så kan dette skyldes flere ting. Det kan være svakheter ved analysemetoden, unøyaktig utført analyse eller fravær av sirkulerende kreftceller i blodet. Årsaken til at pasient 11 hadde et svakt positivt utslag i den ene parallellen kan være kontaminerende epitelceller som har forurenset prøven. Det kan være fra huden på prøvetakingsstedet eller annen forurensing. Det er selvfølgelig også en viss sjanse for at pasienten hadde sirkulerende epitelceller.

Antall prøver som ble undersøkt er lite og det er vanskelig å trekke helt klare konklusjoner ut fra resultater av de analyser som er gjort. Det ser imidlertid ut som om det er



en klar tendens til at mange pasienter med brystkreft, har CK-19 positive celler i blodet som kan detekteres ved metodene beskrevet her.

Det som er klart er at metodene må videreutvikles mer for å få til en enda mer ideel, sensitiv og spesifikk test. Noen av årsakene til dette diskuteres her.

I denne type forsøk er det et gjennomgående problem med kontaminering av epitelceller i prøvene (17). Vi prøvde å unngå dette ved å kaste de 5 første milliliterene med blod fra blodprøven. I tillegg la vi vekt på å verne prøvene under hele analyseprosessen for kontaminering av prøvene med epitelceller fra laborantene.

Firmaet Qiagen som produserer Rneasy Mini Kit vi brukte til isolering av RNA, har i ettertid kommet med blodprøveglass kalt PAXgene Blood RNA System på markedet. Disse glassene inneholder en blanding av reagenser som stabiliserer RNA([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) bedre enn EDTA-glass som vi brukte i vår studie. Ved å bruke disse nye glassene kunne vi kanskje fått et bedre bilde av mRNA-nivået i blodprøvene da det er et problem at mRNA er ustabil og degraderes raskt som en del av cellas regulering av genuttrykk (21). For å minimere problemet med degradering av mRNA la vi vekt på å starte isoleringen umiddelbart etter anrikningen.

En annen årsak til at resultatene er usikre, er tap av celler i analyseprosessen. Vi har ikke gjort undersøkelser på dette og det er vanskelig å finne eksakte studier men det er ganske klart at det tapes celler og cellemateriale både under skyllingen av magnetkulene under seleksjonsprosessen, isoleringen av RNA og oppkonsentreringen av cDNA. I alle disse prosessene gjør man skyllinger (se materiale og metode) hvor det er naturlig at noen kreftceller vil gå tapt og det vil påvirke det endelige resultatet i retning av høyere Ct-verdier.

En studie fra Østerrike har vist at høyt uttrykk av EPCAM antigen korrelerer med dårligere prognose hos brystkreftpasienter (22). I denne studien fant man overuttrykk av EPCAM hos bare 35,6% av 205 brystkreftpasienter vha biopsier. Det er sannsynlig at noen brystkreftceller uttrykker lite EPCAM-antigen. Derfor kan man ved seleksjon av EPCAM-positive celler redusere andelen falske positive, men øke andelen av falske negative. En måte å løse dette på er å bruke antistoffer med flere spesifisiteter rettet mot flere overflatemolekyler i den positive seleksjonsprosessen..

Studier der man brukte cDNA microarray på prøver fra 78 og 65 brystkreftpasienter har vist at hver tumor uttrykker ulike mengder av ulike gener (23,24). Ut fra dette genuttrykksmønsteret kan man klassifisere mammaecancer i undergrupper. Dette viser en heterogenitet som gjør det vanskelig å selektere for cancerceller i perifert blod ved hjelp av

ett overflatemolekyl og gjøre PCR på kun ett genuttrykk hvis målet er å lage en generell test for cancerceller.

Sensitiviteten av testen kan økes ved å kjøre kvantitativ PCR på flere genprodukt enn CK-19. I en studie av Fellowes et al. (submitted) har man i tillegg til CK-19 også kjørt PCR på Epidermal Growth Factor Reseptor (EGF-R). Forsøkene er gjort med seleksjon og kvantitativ PCR etter å ha blandet ulike konsentrasjoner av brystkreftcellelinjer med normale celler i ulike konsentrasjoner. Resultatet ble en sensitivitet på 1 tumorcelle på 5 millioner normale mononukleære celler. Den samme forskergruppen jobber nå også med et tredje genprodukt, Carcino Embryonalt Antigen (CEA). Resultatene fra disse forsøkene foreligger ikke ennå. Den samme studien viste også at man får ulik sensitivitet i ulike cellelinjer. Én cellelinje, HS578T, viste en sensitivitet på 1 tumorcelle per 5,000-50,000 normale celler. Også andre studier har vist at ulike cellelinjer gir ulik sensitivitet (25,16). Dette kan bety at ulike typer cancerceller uttrykker ulike mengder mRNA, Ber-EP4 antigen og/eller EPCAM-molekyler på overflaten. Dette har også vært påvist i en studie av Sabile, et al (26). I så fall vil det ikke være korrekt å sammenligne alle prøvene opp mot standardkurver som er laget etter bare én cellelinje. I våre forsøk brukte vi kun standardkurver som er laget av cellelinjen MDA MB 468, mens pasientenes kreftceller mest sannsynlig besto av kloner som ikke nødvendigvis hadde samme overflatemolekyler og genuttrykk som denne cellelinjen. Det er også påvist at ulike antistoffer kan binde sine antigener annerledes enn det som er oppgitt fra produsenten. Dette kan skyldes forskjeller i bindingskinetikk, den cellulære uttrykket av antigener eller en kombinasjon (27). Det ville derfor være mer korrekt å lage standardkurver basert på et kjent antall genkopier fra klonet genmateriale.

En svakhet med RT-PCR reaksjonen er at den er karakterisert av signifikant variasjon i resultater og lite reproducerbart (18). Dette selv om man bruker samme prøvemateriale i ulike laboratorier (28). Dette regner man med kommer av at revers transkriptasen har en variabel effektivitet og at man trenger to enzymatiske trinn (29). PCR-reaksjonens eksponentielle natur sammen med små mengder av målmolekyler gjør at selv små avvik i reaksjonskomponenter, fysiske syklusbetingelser på PCR-maskinen og primereffekt tidlig i PCR-forløpet kan påvirke amplifikasjonsproduktet i stor grad (30). Det viser seg at real-time RT-PCR er signifikant mindre variabelt enn vanlig konvensjonell RT-PCR (18). For Taqman RT-PCR er variasjonen i Ct-verdi beregnet til 2% (31).

Flere forskjellige metoder for å påvise cancerceller i blod er i bruk, med variable resultater, fordeler og bakdeler (32). Man er ved hjelp av PCR-analyser teoretisk i stand til å oppnå sensitivitet på 1 tumorcelle på  $10^7$  –  $10^8$  normale celler (32). Tallene for

immunocytokjemi og flowcytometri er 1 : 10x5 til 1 : 10x6, og 1 : 10x4 til 1 : 10x7 respektivt (32).

Som nevnt tidligere er pasientmaterialet for lite til å komme med noen helt klare konklusjoner ut fra resultatene av de analysene som er gjort ( se Tabell 2 og 3) bortsett fra at det virker som det er en sterk korrelasjon mellom positive prøver og sykdom, og negative prøver hos friske kontroller. Vi har for lite materiale til å si noe om korrelasjon mellom sykdomsaktivitet , behandling og mengde CK-19 genprodukt i pasientprøven. Hvis vi ser på pasient 1 med negative prøver, så har hun hjerne- og skjellettmetastaser og har status T2N1M0. På den andre siden har vi pasient 6 med levermetastaser og gjennomsnitts Ct-verdi på 24,71 og Pasient 10 med skjellettmetastaser og gjennomsnitts Ct-verdi på 23,47. Resten av pasientene ligger mellom disse verdiene uten at det er mulig å se noe mønster i dette.

Når det gjelder behandling så kan det se ut som om pasientene som får strålebehandling generelt har en lav Ct-verdi hvis vi ser bort fra pasient 1. Ellers er det igjen vanskelig å trekke klare linjer ut fra vårt pasientmateriale.

Veien videre for dette prosjektet blir å designe primere og prober for andre tumormarkører. Med kombinasjonen av flere antistoffer for anrikning og flere genuttrykk i kvantitativ PCR test, kan man komme nærmere målet om tidlig og sensitiv deteksjon av brystkreftceller i perifert blod..

## Referanser

1. Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Janssen WE, Mosckinski LC. Clinical significance of bone marrow metastasis as detected by using polymerase chain reactions in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1868-76.
2. Vredensburgh JJ, Silva O, Broadwater G et al. The significance of tumor contamination in the bone marrow from high risk primary breast cancer patients treated with high dose chemotherapy and hematopoietic support. *Biol Blood Marrow Transpl* 1997; 3: 91-97.
3. Pantel K. Detection of minimal disease in patients with solid tumors. *J Hematotherapy* 1996; 5: 359-67.
4. Martin VM, Siewert C, Scharl et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol* 1998; 26: 252-64.
5. Naume B, Borgen E, Beiske K et al. Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood. *J Hemotherapy* 1997; 6: 103-14.
6. Racila E, Euhus D, Weiss AJ et al. Detection and characterisation of carcinoma cells in blood. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 4539-94.
7. Husebekk A, Fellowes VS, Vance BA et al. A sensitive and spesific test for detection of breast cancer cells in peripheral blood. *Blood* 2002; 100 (11): abstract no 4023.
8. Wang H, Thoresen SØ, Tretli S. Breast cancer in Norway 1970-1993: a population-based study on incidence, mortality and survival. *British Journal of Cancer* 1998; 77 (9): 1519-1524.
9. Wang H. Epidemiological studies of breast cancer in Norway. University of Oslo: Unipub as, 2002: 1-28.
10. Morris PJ, Wood WC. *Oxford Textbook of Surgery*. University of Oxford: Oxford University Press, 2000: 1191-1200.
11. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Basic Pathology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997: 629-634.
12. Kleinsmith LJ, Kish VM. *Principles of Cell and Molecular Biology*. New York: HarperCollins College Publishers, 1995: 619-621.
13. Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. New York: Scientific American Books, 1995: 161,1106.
14. Terstappen WMM et al. Flowcytometry – Principles and Feasibility in Transfusion Medicine. Enumeration of Epithelial Derived Tumor Cells in Peripheral Blood. *Vox Sanguinis* 1998; 74 (Suppl. 2): 269-274.
15. Wheaters P, Young B, Heath JW. *Functional Histology*. London: Churchill Livingstone, 2000: 3.
16. Slade MJ et al. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastasis in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*, 1999; 17, 870.
17. Shamma FV et al. Serial Quantitative PCR Analysis of Bone Marrow Samples from Breast Cancer Patients to Monitor Systemic Micrometastases. *Anticancer Research*, 2001; 21: 2099-2106.
18. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000; 25: 169-193.
19. Shamma FV. Detection of systemic micrometastases in breast cancer patients by quantitative polymerase chain reaction. University of Oslo: Unipub AS; 2003: 20-22.
20. Lehninger AL, Nelson DL, Cox M M. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers, 1993: 998.

21. Bevilacqua A, Ceriani MC, Cappaccioli S, Nicolini A. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* 2003; 195(3): 356-372.
22. Spizzo G et al. Prognostic significance of Ep-CAM and Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 98(6): 883-888.
23. Sørlie et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 2001; 98(19): 10869-10874.
24. Perou CM et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797): 747-752.
25. Taback B et al. Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by multimolecular marker assay: correlation with clinical stage disease. *Cancer Res* 2001; 61(24): 8845-8850.
26. Sabile A et al. Efficiency of Ber-EP4 antibody for isolating circulating epithelial tumor cells before RT-PCR detection. *Am J Clin Pathol* 1999; 112(2): 171-178.
27. Chosy EJ et al. Characterization of Antibody Binding to Three Cancer-Related Antigens Using Flowcytometry and Cell Tracking Velocimetry. *Biotechnol Bioeng* 2003; 82: 340-351.
28. Keilholz U et al. Reliability of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)-based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. *Eur J Cancer* 1998; 34(5): 750-753.
29. Bishop GA et al. Quantitative reverse transcriptase-PCR amplification of cytokine mRNA in liver biopsy specimens using a non-competitive method. *Immunol Cell Biol* 1997; 75(2): 142-147.
30. Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, Wallace RB. The effect of temperature and oligonucleotide primer on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 1991; 10(3): 233-238.
31. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10): 986-994.
32. Ross AA. Minimal residual disease in solid tumour malignancies: a review. *J Hematother* 1998; 7(1): 9-18.

