

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Endometroides Adenokarzinom: Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) mit
Hilfe von spezifischen Real-Time-PCR-Markern**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rebekka Wellens
aus
Passau
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Doris Mayr
Prof. Dr. Anne Krug

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Dr. med. Ulrich Andergassen
Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2018

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Endometriumkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.2 Symptomatik, Diagnostik und Früherkennung	2
1.1.3 Klassifikation	3
1.1.3.1 Stadieneinteilung (Staging)	3
1.1.3.2 Histopathologische Klassifikation und Grading.....	4
1.1.4 Ausbreitung und Metastasierung	5
1.1.5 Therapie und Prognose	5
1.2 Zirkulierende Tumorzellen („CTCs“).....	8
1.3 Quantitative Echtzeit-PCR als Methode der Detektion von CTCs.....	10
1.4 Markergene.....	12
1.4.1 Cytokeratin 19	12
1.4.2 Cytokeratin 20	13
1.4.3 CCNE2	13
1.4.4 MAL2.....	14
1.4.5 Mig-7	14
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Verfahren.....	16
2.1.1 Zellisolierung aus EDTA-Vollblut	16
2.1.2 Gewinnung von RNA und cDNA	17
2.1.2.1 RNA-Extraktion mit Trizol.....	17
2.1.2.2 Konzentrationsmessung der RNA	18
2.1.2.3 Berechnung der RNA-Menge und Umschreibung in cDNA	18
2.1.3 RT-PCR.....	20
2.1.3.1 Plattenbelegung.....	20
2.1.3.2 Probenvorbereitung und Pipettieren.....	21

2.1.3.3 Auswertung der RT-PCR.....	21
2.2 Zellkulturen	22
2.2.1 Zelllinien	22
2.2.2 Kultivierung und Abnahme.....	23
2.2.3 Zellzählung	24
2.3 Patientenproben.....	24
2.4 Methodisches Vorgehen	26
2.4.1 Spiking-Experimente	26
2.4.2 Mykoplasmentest.....	26
2.4.2.1 Probenaufbereitung.....	26
2.4.2.2 PCR-Amplifikation	27
2.4.2.3 Gel-Elektrophorese	27
2.4.3 Übertragung auf Patientinnen mit Endometriumkarzinom	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Ergebnisse der Spiking-Experimente	29
3.1.1 Konzentrationen und Ratios der extrahierten RNA	29
3.1.2 Genexpressionswerte aus der RT-PCR der Spiking-Experimente	30
3.1.2.1 Ergebnisse für CK20	32
3.1.2.2 Ergebnisse für CCNE2.....	34
3.1.2.3 Ergebnisse für MAL2.....	35
3.1.2.4 Ergebnisse für CK19	37
3.1.2.5 Ergebnisse für Mig-7	39
3.2 Mykoplasmentest.....	42
3.3 Ergebnisse bei Testung der Patientenproben	44
3.3.1 Konzentrationen und Ratios der extrahierten Patienten-RNA	44
3.3.2 Ermittelte RT-PCR-Ergebnisse aus den Patientenversuchen	44
3.4 Statistische Auswertung.....	50
4 Diskussion.....	52
4.1 Vorversuche: Spiking-Experimente	52
4.2 Untersuchung der Patientenproben.....	53

4.3 Ausblick	55
5 Zusammenfassung	57
6 Anhang	IV
6.1 Literaturverzeichnis:	IV
6.2 Abbildungsverzeichnis	XI
6.3 Tabellenverzeichnis	XII
6.4 Abkürzungsverzeichnis	XIII
6.5 Material und Geräte	XIV
6.6 Ethikantrag	XIX
Poster und Veröffentlichung	XX
Eidesstattliche Erklärung	XXI
Danksagung	XXII

1 Einleitung

1.1 Endometriumkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Jährlich erkranken weltweit circa 142 000 Frauen an einem Endometriumkarzinom, womit es sich um das siebthäufigste Malignom der Frau handelt. In etwa 42 000 Patientinnen pro Jahr versterben an der Erkrankung [1]. Die Inzidenz variiert stark zwischen unterschiedlichen Regionen. In Europa und Nordamerika, den Teilen der Welt mit der höchsten Inzidenz, ist das Endometriumkarzinom der häufigste weibliche Genitaltumor und nach Brustkrebs, Lungenkrebs und kolorektalem Karzinom die meist vorkommende Krebserkrankung [2, 3]. Deutschland verzeichnet derzeit circa 10 930 Neuerkrankungen pro Jahr. Die Zahl der erkrankten Frauen steigt mit zunehmendem Alter, der Erkrankungsgipfel liegt hierbei zwischen 75 und 80 Jahren [1].

Für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms existieren zahlreiche gesicherte Risikofaktoren:

Hormontherapie. Eine Östrogen-Monotherapie steigert nachweislich das Erkrankungsrisiko durch den stimulierenden Effekt des Östrogens, wenn sie ohne protektives Gestagen verabreicht wird [4]. Auch unter Behandlung mit Tamoxifen konnte eine erhöhte Inzidenz beobachtet werden. Bei Tamoxifen handelt es sich um einen Östrogen-Rezeptor-Modulator, der in der Therapie des östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinoms eingesetzt wird [5, 6].

Adipositas. Da im Fettgewebe vermehrt Östrogene freigesetzt werden, stellt Übergewicht ebenso einen Risikofaktor dar. Zahlreiche Studien zeigten, dass Frauen mit Adipositas vermehrt dazu neigen, ein Endometriumkarzinom zu entwickeln [7-9].

Reproduktive Faktoren. Durch Schwangerschaften wird die Stimulation der Gebärmutter-schleimhaut mit Östrogenen unterbrochen, weshalb sie sich protektiv auf das Endometrium auswirken und Nulliparität folglich als Risikofaktor angesehen werden kann [10]. Eine lange Phase mit Menstruationsblutungen im Leben einer Frau zieht ebenfalls mit sich, dass das Endometrium eine lange Zeit der Östrogenwirkung ausgesetzt ist und steigert die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung des Gewebes [11].

PCO-Syndrom. Frauen mit PCO-Syndrom (Polyzystisches Ovar-Syndrom) leiden unter chronischer Anovulation mit erhöhter Östrogenkonzentration. Diese führt zu einem bis zu 4-fach erhöhten Risiko für ein Endometriumkarzinom [12].

Genetische Erkrankungen. Die autosomal-dominant vererbte Erkrankung HNPCC (hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom) führt mit einem Lebenszeitrisiko von 40-60 % zur Entwicklung eines Endometriumkarzinoms [13].

Positive Tumoranamnese. Die Wahrscheinlichkeit für ein Endometriumkarzinom steigt auch mit positiver Familienanamnese für Gebärmutterkrebs und bei Frauen die bereits von Brust- oder Eierstockkrebs betroffen waren [3, 14].

Als Faktoren welche das Erkrankungsrisiko senken gelten Multiparität, Rauchen, orale Kontrazeption und körperliche Aktivität.

1.1.2 Symptomatik, Diagnostik und Früherkennung

Hauptsymptom ist die postmenopausale uterine Blutung. Die Symptomatik tritt häufig in der Frühphase auf und sorgt für eine Diagnose in frühen Stadien [2, 15]. Alle Patientinnen mit postmenopausaler Blutung und weiteren Risikofaktoren für die Entwicklung eines Endometriumkarzinoms (Adipositas, Alter > 40 Jahre, Östrogen-/Tamoxifentherapie, PCO-Syndrom) sollten sich einer weiteren diagnostischen Abklärung unterziehen. Bei den Patientinnen in der Postmenopause, die sich mit einer Blutung vorstellen, liegt die Wahrscheinlichkeit für ein Endometriumkarzinom bei 5 bis 10 %, zunehmend mit fortschreitendem Alter der Frau [16]. Weitere, weniger häufige Symptome sind Schmerzen beim Wasserlassen oder Geschlechtsverkehr, vaginaler Ausfluss und Gewichtsverlust [17].

Etablierte Verfahren zur **Diagnostik** bei symptomatischen Frauen sind die transvaginale Sonographie und bei verdächtigem Befund eine darauffolgende Hysteroskopie mit fraktionierter Abrasio. Vorher sollte mit einer gynäkologischen Untersuchung sichergestellt werden, dass es sich um eine uterine Blutung handelt [18, 19]. Ziel der Sonographie ist die Messung der Dicke des Endometriums. Hierbei gilt bei postmenopausalen Patientinnen eine einfache Endometriumsdicke von mehr als 5 mm als verdächtig, worauf eine histologische Abklärung mit Hilfe der Kürettage folgen sollte [20].

Eine **Standard- oder Screeninguntersuchung** wird derzeit nicht empfohlen, da durch die Frühsymptomatik oft eine frühe Diagnosestellung möglich ist [3]. Auch bei Hochrisikopatientinnen (Frauen mit Adipositas, PCO-Syndrom, HNPCC, Endometriumshyperplasie) konnte der Nutzen einer Früherkennungsuntersuchung beispielsweise durch Sonographie bisher nicht nachgewiesen werden [21].

1.1.3 Klassifikation

1.1.3.1 Stadieneinteilung (Staging)

Unter Staging wird der Teil der Diagnostik beschrieben, der dazu dient, den Ausbreitungsgrad und damit auch das weitere therapeutische Vorgehen bei einer malignen Tumorerkrankung festzulegen [22]. Im Rahmen dieser Stadieneinteilung werden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, teilweise ist eine endgültige Klassifikation nur durch operatives Vorgehen möglich. Auch für das Endometrium existiert eine Einteilung nach der TNM-Klassifikation, ein inzwischen sehr weit verbreitetes Verfahren für die Stadieneinteilung maligner Tumoren das seit 1950 von der UICC (Union internationale contre le cancer) entwickelt und mit internationaler Gültigkeit festgesetzt wird. Die Kategorien der TNM-Klassifikation entsprechen den drei Buchstaben:

T=Ausdehnung des Primärtumors

N=Vorhandensein/Fehlen von regionären Lymphknotenmetastasen

M=Vorhandensein/Fehlen von Fernmetastasen

Folgende Tabelle zeigt die gültige Einteilung der UICC und zusätzlich auch die FIGO-Klassifikation, welche bei gynäkologischen Tumoren angewandt wird. Die Fédération internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) unterteilt die malignen Tumoren basierend auf einem chirurgischen Staging, also nach operativer Gewebeentnahme, während die TNM-Klassifikation eher klinisch/pathologisch orientiert ist [23-26].

TNM	FIGO	
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Tumor begrenzt auf Corpus uteri
T1a	IA	Tumor begrenzt auf das Endometrium oder infiltriert < Hälfte des Myometriums
T1b	IB	Tumor infiltriert Hälfte oder > als die Hälfte des Myometriums
T2	II	Tumor infiltriert Cervix uteri, breitet sich jedoch nicht jenseits des Uterus aus
T3 und / oder N1	III	lokale und/oder regionäre Ausbreitung
T3a	IIIA	Tumor befällt Serosa und/oder Adnexe (direkte Ausbreitung oder Metastasen)
T3b	IIIB	Vaginal- oder Parametrienbefall (direkte Ausbreitung oder Metastasen)
N1	IIIC	Metastasen in Becken- und/oder paraaortalen Lymphknoten
	IIIC1	Metastasen in Beckenlymphknoten
	IIIC2	Metastasen in paraaortalen Lymphknoten
T4	IVA	Tumor infiltriert Blasen- und/oder Rektumschleimhaut
M1	IVB	Fernmetastasen (ausgenommen Metastasen in Vagina, Beckenserosa oder Adnexen, einschließlich Metastasen in inguinalen und anderen intraabdominellen Lymphknoten als paraaortalen und/oder Beckenlymphknoten)

Tabelle 1: TNM/FIGO-Klassifikation beim Endometriumkarzinom *Quelle: [1]*

Zusätzlich zum operativen Staging werden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Röntgenthorax in zwei Ebenen
- Sonographie des Abdomens, um eine Harnstauung und/oder Metastasierung in pelvinen Oberbauchorganen auszuschließen
- Bei Komorbidität und eventuell geplanter Strahlentherapie eine Magnetresonanztomographie
- Zystoskopie und Rektoskopie zum Ausschluss von Stadium IVA [1, 15, 26]

1.1.3.2 Histopathologische Klassifikation und Grading

Unter „Grading“ wird die Einteilung eines malignen Tumors nach seinem Differenzierungsgrad verstanden, das bedeutet, wie sehr sich das untersuchte Tumormaterial vom ursprünglichen Gewebe unterscheidet. Auch hier erfolgt die Einteilung durch die UICC:

G1: Grad 1, gut differenziertes malignes Gewebe („low-grade“), hohe Übereinstimmung mit Ursprungsgewebe

G2: Grad 2, mäßig differenziertes malignes Gewebe

G3: Grad 3, schlecht/niedrig differenziertes malignes Gewebe [27]

Histologisch wird das Endometriumkarzinom nach WHO unterteilt in [2]:

- Endometroides Adenokarzinom
 - mit Plattenepitheldifferenzierung
 - villoglandulär
 - sekretorisch
 - mit Flimmerepithel
- Andere Adenokarzinome
 - muzinös
 - serös
 - klarzellig
 - Mischtyp
 - Plattenepithelkarzinom
 - Übergangszellkarzinom
 - kleinzellig
 - undifferenziert

Die meisten Patientinnen entwickeln ein gut bis mäßig differenziertes endometroides Adenokarzinom auf dem Boden einer atypischen Hyperplasie, einer Tumorstufe (Präkanzerose). Man bezeichnet diese Tumore als Typ-I-Karzinome, welche östrogenabhängiges Wachstum zeigen. Typ-I-Karzinome haben eine deutlich bessere Prognose als die sogenannten Typ-II-Karzinome, die nur ca. 10 % der malignen Schleimhautläsionen ausmachen [2, 28]. Typ II ist hormonunabhängig und zieht häufig ein hohes Risiko für Rezidiv und Metastasierung mit sich. Die häufigsten Tumore sind hier das seröse und das klarzellige Adenokarzinom [29, 30].

1.1.4 Ausbreitung und Metastasierung

Das Korpuskarzinom metastasiert spät und dann in der Regel nur lymphogen in pelvine oder paraaortale Lymphknoten. In etwa 13% aller Patientinnen erleidet im Laufe der Erkrankung ein Rezidiv. Zur Hälfte handelt es sich dabei um lokale Rezidive in Becken und Vagina, zur anderen Hälfte um Fernmetastasen [1].

1.1.5 Therapie und Prognose

Die Therapie des Endometriumkarzinoms ist abhängig vom Tumorstadium. Grundsätzlich wird operativ und mit kurativem Ansatz therapiert. Hierbei erfolgt folgende Einteilung der Therapieschemata:

Stadium	Therapie
T1a, G1, G2	totale Hysterektomie mit Adnexektomie
T1a, G3 und Stadium T1b	totale Hysterektomie mit Adnex- und pelviner/paraaortaler Lymphadenektomie
T2	erweiterte totale Hysterektomie mit Adnex- und pelviner/paraaortaler Lymphadenektomie
T3	totale Hysterektomie mit Adnex- und pelviner/paraaortaler Lymphadenektomie, Omentektomie, ggf. partielle/komplette Kolpektomie
T4	bei Befall von Blase und/oder Rektum gegebenenfalls vordere und/oder hintere Exenteration, Adnex- und pelvine/paraaortale Lymphadenektomie
N1	totale Hysterektomie mit Adnex- und pelviner/paraaortaler Lymphadenektomie
M1	wenn operabel: Hysterektomie und evtl. Debulking

Tabelle 2: Stadienabhängige Therapie des Endometriumkarzinoms

Bei der operativen Behandlung sollten eine Zytologie der Bauchhöhle, die Hysterektomie, die beidseitige Adnexektomie sowie die pelvine und paraaortale Lymphadenektomie bis zum Nierenstiel durchgeführt werden. Die Lymphknotenektomie und damit eventuelle Entfernung von Lymphknotenmetastasen stellt möglicherweise eine Prognoseverbesserung dar und sollte deswegen erfolgen, wenn der Allgemeinzustand der Patientin dies zulässt. Die Entfernung der pelvinen Lymphknoten kann zu Lymphödemen in Beinen und Unterbauch führen, welche im Rahmen der Nachsorge mit Kompressionsstrümpfen und Lymphdrainagen behandelt werden.

Ist eine Patientin nicht operabel, besteht die Möglichkeit der adjuvanten Strahlentherapie. Diese setzt sich in der Regel aus einer Kombination von Tele- und Brachytherapie zusammen. Unter Brachytherapie versteht man eine Form der Bestrahlung, bei der die Strahlenquelle unmittelbar am zu bestrahlenden Gebiet (in diesem Fall dem Endometrium) platziert wird. Als Chemotherapeutika kommen in fortgeschrittenen Stadien Adriamycin, Cisplatin, Carboplatin, Paclitaxel und Docetaxel zum Einsatz, zeigen jedoch nur geringe Erfolge. Bei Rezidiven und Tumoren, die weder operabel noch einer Strahlentherapie zugänglich sind, verbleibt für östrogen-/progesteronpositive Endometriumkarzinome als Option eine endokrine Therapie mit Gestagenen [1, 26, 31, 32].

Die Prognose wird vor allem bedingt durch die Ausbreitung des Tumors, den histologischen Typ und den Differenzierungsgrad des Karzinoms:

Tumorausbreitung. Dieses Kriterium beinhaltet die operative Stadieneinteilung, die Tiefe der Myometriuminvasion, den Gefäßeinbruch und die zervikale Beteiligung. Die Klassifikation nach FIGO stellt einen prognostischen Parameter dar. Das krankheitsfreie Überleben nach fünf Jahren wurde für FIGO-Stadium I mit 90 %, für Stadium II mit 83 % und für Stadium III mit 43 % beschrieben [33]. Je tiefer ein Tumor in das Myometrium eindringt, desto näher befindet er sich an Nachbarorganen, die infiltriert werden könnten, sowie an Blut- und Lymphgefäßen [34]. Die Anwesenheit von Tumorzellen in Gefäßen, also Räumen die mit Endothelzellen ausgekleidet sind, ist ein starker Prädiktor für Rezidiv und schlechtes Outcome. Sie führt dazu, dass sich die Tumorzellen in Blut- und Lymphwegen verbreiten und es zu einer (Fern-) Metastasierung kommen kann [35].

Histologischer Typ. Je seltener das Vorkommen eines histologischen Typs, desto geringer ist die Überlebensrate. Ein prognostisch ungünstiger Faktor ist folglich der histologische Typ eines serösen oder klarzelligigen Adenokarzinoms. Zusammen mit endometroiden Adenokarzinomen Typ 3 machen sie nur 25% der diagnostizierten Endometriumkarzinome aus, sind jedoch für 75% der assoziierten Todesfälle verantwortlich. Grund für das schlechtere Outcome ist die Neigung dieser beiden Typen bereits früh im Krankheitsprozess außerhalb des Uterus zu streuen [36]. Ein Adenokarzinom im Frühstadium besitzt die beste Prognose [30, 37].

Histologischer Grad. Auch der Differenzierungsgrad (vgl.1.1.3.2) ist ein prognostischer Faktor. In einer Studie mit 600 untersuchten Patientinnen mit Endometriumkarzinom ergab sich für die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem Grad 1 Tumor 94 %, beim Grad 2 84 % und bei Tumoren im Stadium G3 nur 72 % [38]. Somit wird hohe Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe mit einem günstigeren Verlauf assoziiert.

Zusammenfassend können vor allem diejenigen Faktoren als prognostisch ungünstig angesehen werden, die mit einer Ausbreitung und Metastasierung des Endometriumkarzinoms einhergehen. Folglich erscheint es sinnvoll, den Prozess der Streuung des Primärtumors gezielt nachweisen zu können und somit konkreter vorherzusagen, in welchem Stadium sich die Erkrankung befindet bzw. als wie erfolgreich sich bereits unternommene Therapieversuche erwiesen. Eine Möglichkeit zum Nachweis von Tumorgewebe in der Peripherie stellen zirkulierende Tumorzellen (Circulating Tumor Cells, CTCs) dar, deren Untersuchung auch Gegenstand dieser Arbeit ist. Bei ca. 25 % der Betroffenen kommt es postoperativ zu einer Metastasierung oder einem Rezidiv [39]. Dies betont die Wichtigkeit einer konsequenten Nachsorge [40]. Da bisher keine Leitlinientherapie bei Tumorprogress oder Rezidiv existiert,

rücken zirkulierende Tumorzellen als wegweisende Parameter für Diagnostik und Therapieerfolg vermehrt in den Fokus.

1.2 Zirkulierende Tumorzellen („CTCs“)

Erstmals 1869 beschrieb Thomas Ashworth bei der Blutuntersuchung eines Mannes der an einer metastasierten Krebserkrankung verstorben war auffällige Zellen: „... cells identical with those of the cancer itself being seen in the blood may tend to throw some light upon the mode of origin of multiple tumours existing in the same person [41].“

Bei zirkulierenden Tumorzellen (**Circulating Tumor Cells**, CTCs) handelt es sich um Zellen, die sich von einem Primärtumor abgesondert und Zugang zur Blut- bzw. Lymphbahn erlangt haben [42]. Sie zirkulieren im Gefäßsystem und gelten somit als Grundlage für eine Verbreitung des Tumors und nachfolgendes Wachstum von Metastasen in entferntem Gewebe und Organen [43]. Durch eine Infiltration des Knochenmarks werden CTCs zu disseminierten Tumorzellen (**Disseminated Tumor Cells**, DTCs) [44-49]. CTCs sollen folglich einen Mechanismus auslösen welcher entscheidend Prognose und Verlauf von Krebserkrankungen beeinflusst und die Hauptursache der assoziierten Todesfälle darstellt [50]. Zahlreiche untersuchte Fälle von Patientinnen mit Mammakarzinom bei denen die Anwesenheit von CTCs nachgewiesen werden konnte, zeigten einen deutlich schlechteren Outcome. Die Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen war hierbei ein Prädiktor für progressionsfreies und Gesamtüberleben [51-53]. Auch beim Endometriumkarzinom handelt es sich um einen epithelialen Tumor. Trotz der relativ günstigen Prognose bei Früherkennung versterben einige Endometriumkarzinompatientinnen an einem Rezidiv ohne vorhergegangenen Hinweis auf eine extrauterine Ausbreitung ihres Tumors, auch nach kurativ operativer Entfernung. Die Ursache könnten unentdeckte zirkulierende Tumorzellen sein [54].

Das Verbleiben einer kleinen Anzahl von Tumorzellen im Blut oder Knochenmark während oder nach der Behandlung wird **Minimal Residual Disease** genannt (MRD, deutsch: Minimale Resterkrankung). Durch ihre geringe Zahl gestaltet sich der Nachweis schwierig. Dies wird zusätzlich dadurch erschwert, dass der Patient in diesem Stadium zumeist keinerlei Symptomatik zeigt [55]. Es bedarf sehr sensitiver Testmethoden, um die CTCs zu detektieren und somit eine MRD zu diagnostizieren. Die Diagnostik kann entweder direkt in Form von Antikörpern erfolgen, wie z.B. mit Immunzytochemie, Immunfluoreszenz oder Durchflussszytometrie. Darüber hinaus existieren indirekte Nachweismethoden auf Basis von Nukleinsäuren, die RNA-Transkripte mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion bestimmen [56]. Die Immunhistologie macht sich Antikörper gegen spezifische nachzuweisende Strukturen (Antigene) zunutze. Durch Markierung dieser Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen oder radioaktiven Isotopen können die jeweiligen Antigene sichtbar gemacht werden.

Ein Beispiel für eine etablierte Technik zum CTC-Nachweis ist die sogenannte APAAP-Färbung (Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase) [57]. Als immunzytologisches Nachweisverfahren wurde das Cell Search® System (Veridex, LLC®, Warren, USA) durch die U.S. Food and Drug Administration freigegeben. Es handelt sich um ein automatisiertes Verfahren der Anreicherung und der immunzytochemischen Detektion für zirkulierende Tumorzellen [58]. Das System beinhaltet ein CellSave Probenröhrchen (Immunicon, Huntingdon Valley, PA) für Aufbewahrung und Transport, das Cell Search® Epithelzell Kit (Veridex) mit allen notwendigen Reagenzien zur Durchführung des Tests, Cell Search® Kontrollzellen (Veridex), ein automatisiertes Tool zum Hinzufügen und Waschen der Zellen (AutoPrep., Veridex) und ein halbautomatisches Mikroskop um die Ergebnisse einzulesen (CellSpotter Analyzer ; Veridex). Es stellt folglich das erste in sich geschlossene System der automatisierten Anreicherung, Färbung und Auswertung dar [56].

Ein wichtiges Kriterium für die Nutzung der CTC-Diagnostik für Stadieneinteilung und individualisierte Therapie ist, dass lediglich die Tumorzellen selbst detektiert werden. Teilweise liegen in 1 ml Blut nur wenige CTCs im Vergleich zu etwa zehn Millionen Leukozyten und fünf Milliarden Erythrozyten vor. Es stellt somit eine technische Herausforderung dar, eine passende Methode der Detektion zu entwickeln [59, 60]. In dieser Arbeit fiel die Wahl auf den Nachweis durch eine quantitative real-time-PCR (RT-PCR) mit deren Hilfe die Tumorzellen epithelialen Ursprungs von den mesenchymalen Blutzellen unterschieden werden sollten.

1.3 Quantitative Echtzeit-PCR als Methode der Detektion von CTCs

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) kommt unter physiologischen Bedingungen bei der Replikation in Körperzellen vor und wird in vitro als molekularbiologische Methode zur Genamplifikation genutzt. Sie ermöglicht, eine DNA- oder RNA-Sequenz in großer Zahl zu vervielfältigen. Voraussetzung sind ein DNA- bzw. RNA-Strang mit zumindest teilweise bekannter Sequenz (Abfolge von Nukleotiden), passende Primer, Nucleosidtriphosphat-Moleküle und eine hitzestabile Polymerase. Diese stammt vom Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), das sich durch seine Hitzestabilität gut eignet. Wie in Abb. 1 veranschaulicht erfolgt die Reaktion in drei sich wiederholenden Schritten:

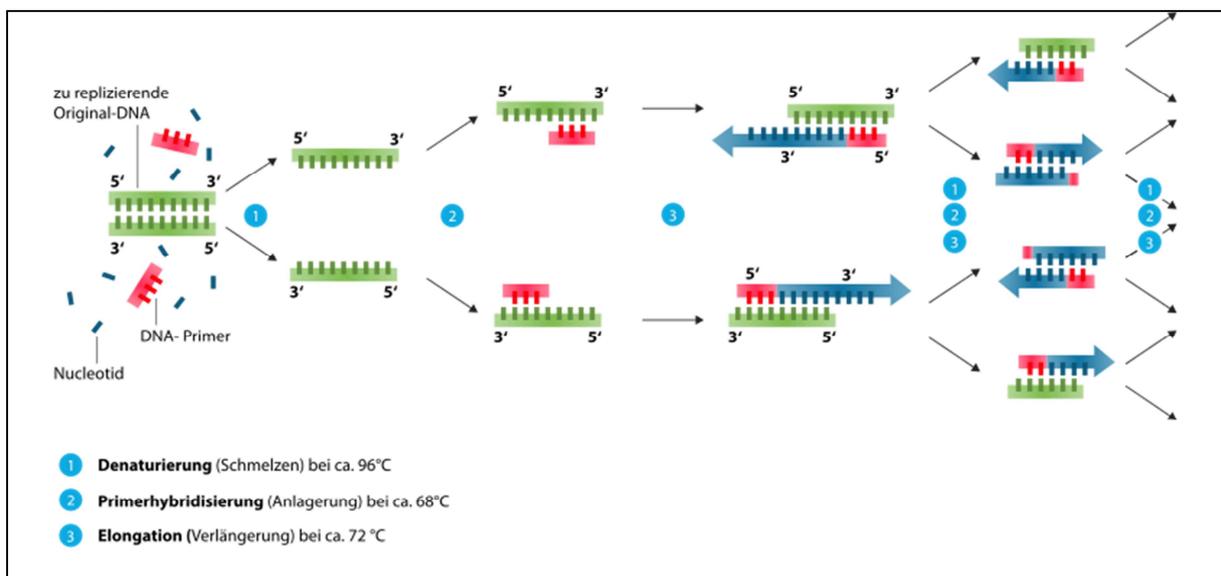


Abbildung 1: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion Quelle: [61]

Denaturierung. In einem ersten Schritt werden durch Erwärmen auf ca. 96°C die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen gelöst, um Einzelstränge herzustellen.

Primerhybridisierung. Die Primer binden nach einer Abkühlung jeweils an das 3ⁱ-Ende der Gensequenz. Dieser Schritt wird auch Annealing genannt.

Elongation. Als letztes in der Abfolge werden nach erneuter geringfügiger Temperaturerhöhung durch die Taq-Polymerase komplementäre Stränge synthetisiert. Für die wechselnden Temperaturstufen wird meist ein Thermocycler verwendet [62, 63].

Die sogenannte quantitative Echtzeit-PCR oder engl. real-time quantitative PCR ist eine Variante der PCR in der durch Fluoreszenzsignale eine Quantifizierung der DNA durchgeführt werden kann. Diese erfolgt in Echtzeit (engl. real time) und wird dadurch ermöglicht, dass die Fluoreszenz mit ansteigender Menge der PCR-Produkte proportional zunimmt [64]. Im Rahmen dieser Studie fiel die Wahl auf die hochsensitive Methode der TaqMan™ RT-PCR. Bei TaqMan™ handelt es sich um eine Sonde, bestehend aus einem Reporter- und einem

Quencher-Farbstoff. Durch den Quencher werden der Reporter und dessen Fluoreszenz unterdrückt. Sobald die Freisetzung des Reporters durch die Taq-Polymerase erfolgt, kann die Emission des Reporterfarbstoffs gemessen werden (vgl. Abb. 2). Die Emission ist folglich Maß für die Menge an DNA [64-66].

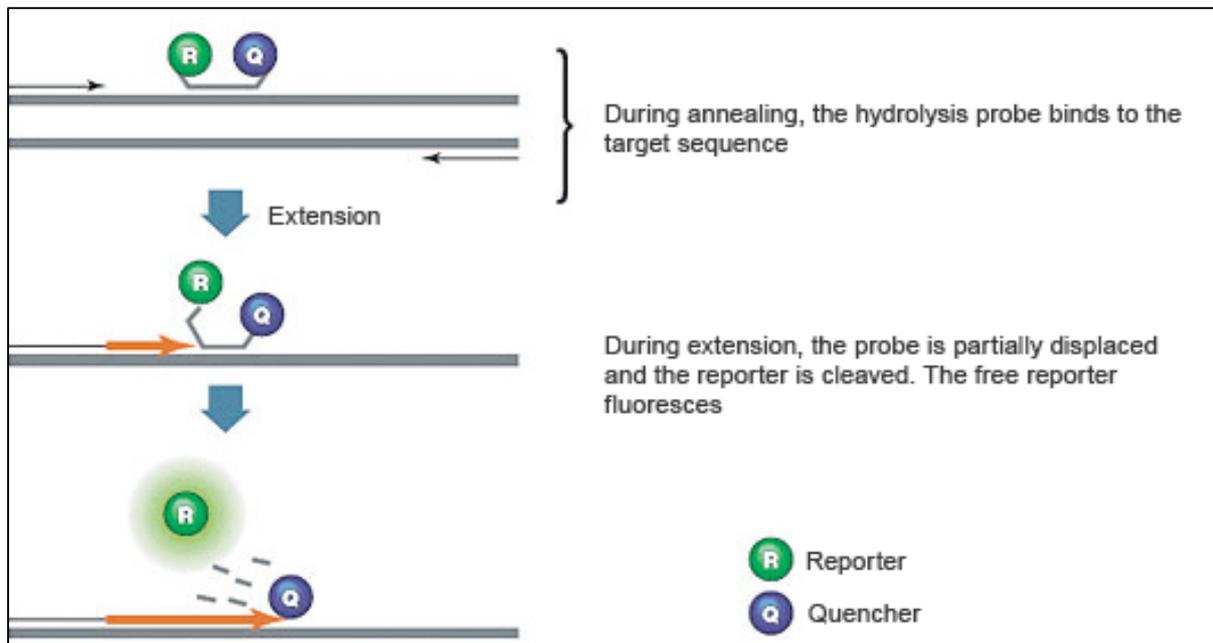


Abbildung 2: Funktionsweise der TaqMan™-Sonde *Quelle: [67]*

Es existieren zwei unterschiedliche Methoden der Real-Time-PCR und der darauffolgenden Auswertung: Die absolute und die relative Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung wird die Anzahl der Kopien zu Beginn durch den Bezug des PCR-Signals auf eine Standardkurve bestimmt. Die relative Quantifizierung bezieht das PCR-Signal des betrachteten Targettranskripts auf das einer anderen Probe, wie beispielweise einer unbehandelten Kontrollgruppe oder internen Kontrolle. Eine absolute Quantifizierung ist nur dann relevant, wenn die exakte Anzahl der Kopien bestimmt werden muss. Ist lediglich eine Aussage darüber interessant, um wie viel - wie z.B. das doppelte, 2,5fache etc, - sich die Expression eines bestimmten Gens erhöht hat, ist eine relative Quantifizierung ausreichend. Diese wurde auch in der vorliegenden Arbeit zur Ermittlung der Genexpression verwendet. Hierfür werden sogenannte Haushaltsgene (engl. „housekeeping genes“) oder auch Kontrollgene als Referenz benötigt, die im Unterschied zu regulierten Genen stets exprimiert werden und somit in größerer Menge vorhanden sind [68]. Im Idealfall wird ihre Expression durch unterschiedliche Versuchsbedingungen nicht beeinflusst. In dieser Versuchsreihe wurde mit GAPDH und 18S rRNA als „housekeeping genes“ gearbeitet. Bei GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) handelt es sich um ein Enzym, das den sechsten Schritt der Glykolyse katalysiert und darüber hinaus an zahlreichen weiteren Prozessen beteiligt ist, wie beispielsweise an der DNA-Reparatur, der Membranfusion und dem Transport in der Zelle [69]. Ribo-

somale Ribonukleinsäuren bilden zusammen mit Proteinen die Ribosomen. Diese sind in der Zelle Produktionsstätte für Proteine. Ribosomale Ribonukleinsäure 18S (kurz 18S rRNA) ist eine ribosomale Untereinheit der Eukaryoten (Lebewesen, deren Zellen einen Zellkern besitzen). Sie gehört zur kleinen Untereinheit 40S und ist somit grundlegende Komponente aller eukaryotischen Zellen [70]. Beide Gene waren bereits Bestandteil zahlreicher Studien und haben sich als Referenzen etabliert [68, 71-73].

Mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode können die relativen Veränderungen in der Genexpression berechnet werden, die durch Anwendung einer relativen Quantifizierung bestimmt wurden (siehe 2.1.3.3) [74].

Der Erfolg der PCR ist abhängig von der Auswahl von geeigneten Targets mit denen sich Tumorzellen von hämatopoetischen Zellen unterscheiden lassen [75]. Um CTCs nachweisen zu können, werden spezifische Marker benötigt, die Bestandteil der Tumorzellen jedoch nicht der normalen Blutzellen und sonstigen im Blut befindlichen Zellen sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach Recherche fünf Markergene für die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen beim Endometriumkarzinom ausgewählt. Es handelt sich hierbei um CK 19, CK20, MAL2, CCNE2 und Mig-7.

1.4 Markergene

1.4.1 Cytokeratin 19

Zytokeratine (CK, Keratine) umfassen eine Genfamilie von 20 verschiedenen Polypeptiden (CK1 bis CK20). Man unterteilt in Typ I Zytokeratine, eine saure und in Typ II, eine basische Subfamilie. CK9 bis einschließlich CK20 sind saure Zytokeratine [76]. Als Intermediärfilamente (Bestandteile des Zytoskeletts zur mechanischen Stabilisierung) von epithelialen Zellen werden sie in Abhängigkeit vom Zelltyp und vom Differenzierungsgrad in unterschiedlichem Maße exprimiert [77]. Gesundes Gewebe kann genauer klassifiziert werden, während die Zytokeratine aber auch Anwendung in der Tumordiagnostik finden. Wird in einem Tumor Zytokeratin nachgewiesen, kann daraufhin rückgeschlossen werden, dass er epithelialen Ursprungs ist [78]. Zytokeratin 19 wird in einer Vielzahl von verschiedenen Epithelzellen exprimiert und erhöhte Serumspiegel wurden bereits mit Malignomen wie Mamma-, Ovarial-, Zervix-, Bronchial-, Leber- und kolorektalem Karzinom assoziiert [79-83]. Es wurde auch unter Zuhilfenahme der APAAP-Färbung untersucht [84, 85]. Beim Mammakarzinom hat es sich bereits als Marker bei der Detektion von CTCs in Blut und Knochenmark etabliert und soll nun auch auf seine Expression in Endometriumkarzinomzellen untersucht werden [86-91].

1.4.2 Cytokeratin 20

Bei Zytokeratin 20 (CK20, Keratin 20) handelt es sich ebenfalls um ein Typ I Zytokeratin [92]. Im Normalgewebe konnte Zytokeratin 20 in Magen-Darm-Epithel, Urothel und in Merkelzellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. In Endometriumkarzinomzellen wurde per Immunhistochemie eine geringe Expression gemessen, während es sich im gesunden Endometrium nicht feststellen ließ [93, 94]. Mit Hilfe der RT-PCR wurden höhere Werte der Genexpression erzielt, was auf eine höhere Sensitivität dieser Nachweismethode schließen lässt [77]. Darüber hinaus konnte in normalen hämatopoetischen Zellen per RT-PCR kein Zytokeratin 20 detektiert werden, weshalb es sich als spezifischer Nachweis von metastasierten Tumorzellen im Blut eignen könnte [75].

1.4.3 CCNE2

Bei Cyclin E2 (CCNE2) handelt es sich um ein vom CCNE2-Gen codiertes menschliches Protein, das seit 1998 bekannt ist. Als Cyclin gehört es zu den Proteinen die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind [95]. Cyclin E1 und Cyclin E2 spielen vor allem im Übergang von der G1-Phase (Growth 1 Phase), in der die Zelle an Größe zunimmt und mRNA und Proteine synthetisiert, zur S-Phase (Synthese-Phase), in der die DNA repliziert wird, eine Rolle [96]. CCNE2 bildet einen Komplex mit einer cyclin-abhängigen Kinase (cyclin-dependant Kinase, CDK), der CDK2, der durch Phosphorylierung eine Vielzahl an Zellprozessen steuert [97]. Der Verlust eines normal regulierten Wachstums ist Kennzeichen der Krebsentstehung. Erhöhte Spiegel von CCNE2 konnten mit einer vermehrten genomischen Instabilität in Verbindung gebracht werden, was bedeutet, dass sie zu einem erhöhten Anteil an atypischen Mitosen und Chromosomenaberrationen führten [98]. Darüber hinaus wurde auch beim primären Mammakarzinom eine Überexpression an Cyclin E2 festgestellt. Sie war assoziiert mit einem aggressiveren Phänotyp der Erkrankung und schlechterem Outcome für die Betroffenen [99]. In einer Multimarkeranalyse von gynäkologischen Tumoren durch Real-Time-PCR wurden 38 Krebszelllinien von erstdiagnostizierten Mamma-, Ovarial-, Zervix- und auch Endometriumkarzinomen unter anderem auf die Expression von CCNE2 untersucht. Während sich CCNE2 in den Blutproben der gesunden Kontrollgruppe nicht nachweisen ließ, zeigte es bei allen untersuchten Karzinomen im Vergleich höhere Expressionswerte [100]. Auch in einer weiteren Studie konnte eine Überexpression im endometroiden Adenokarzinom festgestellt werden [101]. Da CCNE2 als Markergen beim Endometriumkarzinom ansonsten bisher eher selten Gegenstand von Untersuchungen war, es aufgrund seiner entscheidenden Eigenschaften im Zellzyklus aber eine wichtige Rolle in der Onkogenese spielt und auch bei gynäkologischen Tumoren nachgewiesen werden konnte, wurde es im Rahmen dieser Arbeit auf seine Tauglichkeit bei der CTC-Diagnostik untersucht.

1.4.4 MAL2

Für die Funktion einer Epithelzelle essentiell ist der polarisierte Transport von Lipiden und Proteinen zur apikalen (nach außen/zu einem Lumen gerichteten) und basolateralen (mit den Nachbarzellen in Kontakt stehende) Membrandomäne. Hierbei existieren ein sogenannter direkter Weg vom Golgi-Apparat aus und ein indirekter Weg, die Transzytose, ein Transport durch die Zelle hindurch. Die MAL Proteinfamilie und damit MAL1 und MAL2 sind an diesen Transportwegen beteiligt, MAL2 vor allem am indirekten Weg [102, 103]. Abb. 3. zeigt MAL1 und MAL2 in einer Epithelzelle.

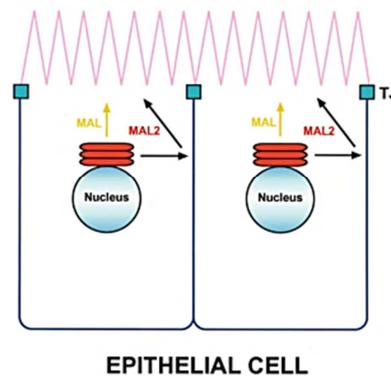


Abbildung 3: MAL2 in der Zelle Quelle: [102]

MAL2 ist ein integrales Membranprotein, also fest in die Zellmembran eingelagert. Es konnte bisher vor allem in HepG2-Leberzellen [103] und einer Vielzahl von anderen epithelialen Zellen nachgewiesen werden [104]. Die wesentliche Rolle von MAL2 beim Stofftransport in polarisierten Epithelzellen lässt darauf schließen, dass sich Veränderungen in seiner Expression in einer abnormalen Zellfunktion widerspiegeln [105]. Neben CCNE2 war auch MAL2 Teil der Multigenanalyse von Obermayr et al. 2010 und sein Nachweis in gynäkologischen Tumoren Gegenstand dieser Studie. Sowohl CCNE2 als auch MAL2 befinden sich auf Chromosom 8q, einer Region, die vor allem beim Mammakarzinom und auch anderen Tumoren eine vermehrte Anzahl an Kopien aufwies [106]. Auch bei MAL2 ließen sich in der Multimarkeranalyse per Real-Time-PCR beim Mammakarzinom, ovariellen und zervikalen Tumoren und auch beim Endometriumkarzinom erhöhte Werte der Expression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe verzeichnen [100]. Deshalb liegt auch hier die Vermutung nahe, dass es sich um ein Markergen handeln könnte, mit dessen Hilfe ein Nachweis von CTC ermöglicht wird und eine weitere Untersuchung in Bezug auf das Endometriumkarzinom interessant ist.

1.4.5 Mig-7

Beim Migration-inducing-gene 7 (Mig-7) handelt es sich um ein 22kDA großes, zystinreiches Membranprotein. Es wird vor allem kurz vor und während der Tumorzellmigration exprimiert und ist somit an der Metastasierung beteiligt [107]. Ein Abfall der Mig-7 Expression führt in

vivo zu einem verminderten bzw. verlangsamten Tumorwachstum. Wahrscheinlich kann dies mit einer Hemmung der lokalen Zellinvasion begründet werden [108]. Mig-7 wurde bereits immunhistochemisch und per RT-PCR auf seine Expression untersucht, wobei es sich im Tumorgewebe von Endometriumkarzinom und auch Bronchialkarzinomen, Darm- und Ovarialtumoren nachweisen ließ, während es im gesunden Gewebe nicht detektiert werden konnte [107, 109, 110]. Auch bei gezielten Untersuchungen von epithelialen Endometriumkarzinom-Zelllinien wie HEC-1A und RL95-2 wird Mig-7 induziert bevor die Migration stattfindet, dies erfolgt jedoch nicht in gesunden epithelialen Endometriumzellen [109]. Da es sich um einen tumorzellspezifischen Marker handelt, welcher vor allem an der Ausbreitung und Metastasierung beteiligt ist, könnte ein Nachweis den Krankheitsverlauf besser vorhersagbar machen und somit eine gezieltere Therapie ermöglichen.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, Real-Time-PCR-Marker für den Nachweis von CTCs des Endometriumkarzinom zu etablieren. Um dies umzusetzen, erfolgte ein Vorgehen in zwei Schritten.

1. In einer ersten Versuchsreihe wird ein Modellsystem erstellt. Die Marker CK19, CK20, MAL2, CCNE2 und Mig-7 werden an mit Tumorzellen versehenen Blutproben gesunder Spenderinnen hinsichtlich ihrer Genexpression getestet. Dies ist essentielle Vorstufe für die weitere Testung an Patientenproben.
2. Die Ergebnisse aus diesen Vorversuchen werden im Anschluss mit den geeigneten Real-Time-PCR-Markern auf die Blutproben von Patientinnen mit Endometriumkarzinom übertragen. Die Marker, die sich im Vorfeld als aussagekräftig erwiesen haben, werden untersucht.

Die daraus resultierenden Forschungsergebnisse sollen dazu beitragen, die Detektion von CTCs und damit die Diagnose einer Minimal Residual Disease zu ermöglichen. Mit Hilfe dieser Diagnostik könnte ein exakteres Staging mit anschließend gezielterer und individualisierter Therapie von betroffenen Endometriumkarzinompatientinnen zum Einsatz kommen.

2 Material und Methoden

2.1 Verfahren

2.1.1 Zellisolierung aus EDTA-Vollblut

Material:

- EDTA-Röhrchen, Flügelkanüle, Einmalhalter, Stauschlauch, Hautdesinfektionsmittel, Tupfer
- 50 ml FALCON-Röhrchen
- Histopaque 1077
- PBS-Lösung
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Zentrifuge
- Vortexmischer
- Gefrierschrank -80°C

Für die Gewinnung der Proben wurden jeweils 20 ml Blut von gesunden Spendern in EDTA-Röhrchen mit Hilfe einer Flügelkanüle abgenommen. Das EDTA-Blut wurde in 50 ml FALCON-Röhrchen überführt und mit 10 ml PBS verdünnt. Die Abtrennung der Erythrozyten erfolgte mit Hilfe von Histopaque 1077. Hierzu wurde das mit PBS verdünnte EDTA-Vollblut langsam und vorsichtig auf das vorher antemperierte Histopaque geschichtet ohne dabei Histopaque und Blut/PBS-Gemisch zu vermengen. Nach einer Zentrifugation (25 min bei einem Gradienten von 400xg, bei Raumtemperatur, ohne Bremse) waren verschiedene Phasen erkennbar: Als oberste Schicht das Serum, darunter die Leukozytenfraktion und Tumorzellen (insgesamt die Interphase; auch „Buffy Coat“), das Histopaque und ganz unten die Erythrozyten. Die Interphase wurde in ein neues FALCON-Röhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es wurde anschließend erneut zentrifugiert (10 min bei einem Gradienten von 250xg, bei Raumtemperatur, ohne Bremse) und der Überstand abgegossen. Nach Vortexen des am Boden des FALCON-Röhrchens entstandenen Zellpellets, versehen mit weiteren 30 ml PBS, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min bei einem Gradienten von 250xg, bei Raumtemperatur, ohne Bremse). Das Röhrchen wurde dekantiert, über Kopf getrocknet und das FALCON-Röhrchen mit dem Zellpellet anschließend bei -80°C für mindestens 24 Stunden tiefgefroren.

2.1.2 Gewinnung von RNA und cDNA

2.1.2.1 RNA-Extraktion mit Trizol

Die RNA-Extraktion mit Hilfe von Trizol erfolgte an zwei Tagen.

Tag 1:

Material:

- Zell-FALCON-Röhrchen vom Vortag
- RNase freies Eppendorf-Tube
- Trizol-Lösung
- Chloroform-Reagenz
- Isopropanol
- Pipette und Pipettenspitzen
- Vortexmischer
- Zentrifuge
- Gefrierschrank -20°C

An Tag 1 wurde zunächst 1 ml Trizol auf das aufgetaute Zellpellet im FALCON-Röhrchen gegeben und langsam durch Auf- und Abziehen in der Pipettenspitze vermischt. Das Zell-Trizol-Gemisch wurde mit 200 µl Chloroform versehen und anschließend kräftig geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (15 min bei einem Gradienten von 12000xg, bei 4°C ohne Bremse) wurde die entstandene wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in 500 µl Isopropanol pipettiert. Das Gemisch wurde erst geschüttelt, dann bei -20°C über Nacht gelagert.

Tag 2:

Material:

- RNase freies Eppendorf-Tube mit Zellpellet vom Vortag
- Ethanol 75%
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Zentrifuge
- kleine Tischzentrifuge
- RNase freies Wasser (Aqua ad iniectabilia)
- Gefrierschrank -20°C

Am nächsten Tag wurden die Proben zunächst zentrifugiert (10 min bei einem Gradienten von 12000xg, bei 4°C ohne Bremse), um die RNA auszufällen. Der über dem Pellet entstan-

dene Überstand wurde vorsichtig abgenommen und 1 ml kalter Ethanol 75 % hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (10 min bei einem Gradienten von 12000xg, bei 4°C ohne Bremse) wurde das Ethanol abpipettiert ohne das Pellet dabei zu zerstören. In einer kleinen Zentrifuge wurden kurz bei 13000xrpm nachzentrifugiert und letzte Alkoholreste entfernt. Das Pellet wurde im Anschluss kurz angetrocknet, in 20µl RNase freiem Wasser gelöst und bis zur Messung bei -20°C tiefgefroren.

2.1.2.2 Konzentrationsmessung der RNA

Material:

- RNA-Tubes
- Ethanol 75%
- RNase freies Wasser (Aqua adiniectabilia)
- Pipette und Pipettenspitzen
- Photometer mit Messzelle
- Vortexmischer
- Gefrierschrank -20°C

Die RNA-Konzentration und Ratio wurden photometrisch bestimmt und dokumentiert. Für die weitere Verarbeitung wurde möglichst hochqualitative RNA (Ratio der Absorption A bei 260 nm geteilt durch A bei 280 nm zwischen 1,7 und 1,9) verwendet, um eine hohe Reinheit der Nukleinsäuren zu gewährleisten.

Die RNA-Tubes wurden aus dem Gefrierschrank (-20°C) geholt und auf Eis gestellt. Die Messzelle wurde in das Photometer eingesetzt. Zunächst erfolgte ein Nullabgleich des Geräts mit 4 µl Aqua a. i.. Die Messzelle wurde nach jeder Messung mit Ethanol 75 %, Aqua a.i. und einem trockenen Tuch gereinigt. Nach Vortexen der zu messenden Probe wurden 4 µl in die Messzelle pipettiert. Als Ergebnis wurden die Konzentrationen in µg/µl und die Ratio der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm (-A260/280) dokumentiert.

2.1.2.3 Berechnung der RNA-Menge und Umschreibung in cDNA

Berechnung:

Material:

- RNA-Tubes
- RNase freies Wasser (Aqua ad iniectabilia)
- Vakuumzentrifuge

Für eine einfache Umschreibung in cDNA wurden jeweils 4 µg RNA benötigt, ein maximales Volumen von 6 µl war jedoch vorgegeben. Mit Hilfe der zuvor gemessenen Konzentrationen in µg RNA pro µl RNase freiem Wasser im Tube konnten die einzusetzenden Mengen berechnet werden. Berechnete Volumen < 6 µl wurden mit RNase freiem Wasser auf diese ergänzt. Überschritten diese Mengen die maximal einsetzbaren 6 µl (Richtwert $\geq 0,66$ µg/µl als Konzentration notwendig), bestand die Möglichkeit der Vakuumzentrifugation und somit Erhöhung der Konzentration in der entsprechenden Probe.

Umschreibung:

Material:

- RNA-Tubes
- Primer zur Umschreibung in cDNA (oligo-dTs)
- Puffer zur Umschreibung in cDNA (Annealing Buffer)
- Reaction Mix
- Enzyme Mix
- RNase freies Wasser
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Hotblock
- Vortexmischer

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit dem Superscript III First Strand Synthesis Super Mix. Hierzu wurden die RNA-Proben zunächst anzentrifugiert. In ein separates Tube wurden 1 µl Primer (oligo-dTs), 1 µl Annealing Buffer und n µl der RNA (s.o.) pipettiert. Das Gemisch enthielt insgesamt maximal 8 µl, bei Bedarf wurde mit RNase/DNase freiem Wasser auf diese aufgefüllt (s.o.). Nach einer Inkubation von 5 min bei 65°C im Thermoblock und kurzer Abzentrifugation wurden 10 µl First Strand Reaction Mix und 2 µl Super Script II/ RNase OUT Enzyme Mix hinzugegeben und gevortext. Die Proben wurden nun 50 min bei 50°C inkubiert. Als letzter Schritt erfolgte eine Inkubation bei 85°C für 5 min zur Denaturierung der Enzyme. Die cDNA wurde nun bis zur PCR bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Bei Benötigung größerer Mengen an cDNA wurde eine 1,5fache bzw. doppelte Umschreibung angewandt. Das maximale Volumen betrug hierbei 9 µl bzw. 12 µl, die eingesetzte RNA-Menge 6 µg bzw. 8 µg. Entsprechend wurden auch bei Primer, Annealing Buffer, First Strand Reaction Mix und Enzyme Mix die jeweils 1,5fachen bzw. doppelten Mengen verwendet.

2.1.3 RT-PCR

2.1.3.1 Plattenbelegung

Im Anschluss konnte mit Hilfe der RT-PCR die Expression unterschiedlicher Gene untersucht werden. Auf eine sorgfältige Planung der Plattenbelegung wurde stets geachtet. Die folgende Abbildung zeigt die Belegung der PCR-Platte in den Spikingversuchen (unterste Platte) und die Anordnung bei den Patientenversuchen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A Patient 1	CK19	CK19	CCNE	CCNE	MAL2	MAL2	MIG7	MIG7	185	185
B Patient 2	Pat.1:CK19	Pat.1:CK19	Pat.1:CCNE	Pat.1:CCNE	Pat.1:MAL2	Pat.1:MAL2	Pat.1:MIG7	Pat.1:MIG7	Pat.1:185	Pat.1:185
C Patient 3	Pat.2:CK19	Pat.2:CK19	Pat.2:CCNE	Pat.2:CCNE	Pat.2:MAL2	Pat.2:MAL2	Pat.2:MIG7	Pat.2:MIG7	Pat.2:185	Pat.2:185
D Patient 4	Pat.3:CK19	Pat.3:CK19	Pat.3:CCNE	Pat.3:CCNE	Pat.3:MAL2	Pat.3:MAL2	Pat.3:MIG7	Pat.3:MIG7	Pat.3:185	Pat.3:185
E Patient 5	Pat.4:CK19	Pat.4:CK19	Pat.4:CCNE	Pat.4:CCNE	Pat.4:MAL2	Pat.4:MAL2	Pat.4:MIG7	Pat.4:MIG7	Pat.4:185	Pat.4:185
F Patient 6	Pat.5:CK19	Pat.5:CK19	Pat.5:CCNE	Pat.5:CCNE	Pat.5:MAL2	Pat.5:MAL2	Pat.5:MIG7	Pat.5:MIG7	Pat.5:185	Pat.5:185
G Patient 7	Pat.6:CK19	Pat.6:CK19	Pat.6:CCNE	Pat.6:CCNE	Pat.6:MAL2	Pat.6:MAL2	Pat.6:MIG7	Pat.6:MIG7	Pat.6:185	Pat.6:185
H Negativprobe	N.Pr.:CK19	N.Pr.:CK19	N.Pr.:CCNE	N.Pr.:CCNE	N.Pr.:MAL2	N.Pr.:MAL2	N.Pr.:MIG7	N.Pr.:MIG7	N.Pr.:185	N.Pr.:185

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A Patient 8	CK19	CK19	CCNE	CCNE	MAL2	MAL2	MIG7	MIG7	185	185
B Patient 9	Pat.8:CK19	Pat.8:CK19	Pat.8:CCNE	Pat.8:CCNE	Pat.8:MAL2	Pat.8:MAL2	Pat.8:MIG7	Pat.8:MIG7	Pat.8:185	Pat.8:185
C Patient 10	Pat.9:CK19	Pat.9:CK19	Pat.9:CCNE	Pat.9:CCNE	Pat.9:MAL2	Pat.9:MAL2	Pat.9:MIG7	Pat.9:MIG7	Pat.9:185	Pat.9:185
D Patient 11	Pat.10:CK19	Pat.10:CK19	Pat.10:CCNE	Pat.10:CCNE	Pat.10:MAL2	Pat.10:MAL2	Pat.10:MIG7	Pat.10:MIG7	Pat.10:185	Pat.10:185
E Patient 12	Pat.11:CK19	Pat.11:CK19	Pat.11:CCNE	Pat.11:CCNE	Pat.11:MAL2	Pat.11:MAL2	Pat.11:MIG7	Pat.11:MIG7	Pat.11:185	Pat.11:185
F Patient 13	Pat.12:CK19	Pat.12:CK19	Pat.12:CCNE	Pat.12:CCNE	Pat.12:MAL2	Pat.12:MAL2	Pat.12:MIG7	Pat.12:MIG7	Pat.12:185	Pat.12:185
H Negativprobe	N.Pr.:CK19	N.Pr.:CK19	N.Pr.:CCNE	N.Pr.:CCNE	N.Pr.:MAL2	N.Pr.:MAL2	N.Pr.:MIG7	N.Pr.:MIG7	N.Pr.:185	N.Pr.:185

Zeilen/ml	Referenz 185	Referenz GAPDH	Marker CK20	Marker MIG7	Marker MAL2	Marker CCNE
A 0	185:0	GAPDH:0	CK20:0	MIG7:0	MAL2:0	CCNE:0
B 10	185:10	GAPDH:10	CK20:10	MIG7:10	MAL2:10	CCNE:10
C 100	185:100	GAPDH:100	CK20:100	MIG7:100	MAL2:100	CCNE:100
D 1000	185:1000	GAPDH:1000	CK20:1000	MIG7:1000	MAL2:1000	CCNE:1000
E 0	185:0	GAPDH:0	CK20:0	MIG7:0	MAL2:0	CCNE:0
F 10	185:10	GAPDH:10	CK20:10	MIG7:10	MAL2:10	CCNE:10
G 100	185:100	GAPDH:100	CK20:100	MIG7:100	MAL2:100	CCNE:100
H 1000	185:1000	GAPDH:1000	CK20:1000	MIG7:1000	MAL2:1000	CCNE:1000

Abbildung 4: Plattenbelegung Spiking-Experimente und Patientenproben

2.1.3.2 Probenvorbereitung und Pipettieren

Material:

- cDNA aus der Umschreibung
- RNase freies Wasser (Aqua ad iniectabilia)
- 96 Well RT PCR Platte
- Mastermix ((TaqMan® Fast Universal PCR MasterMIX)
- Primer für CK19, CK20, CCNE2, MAL2, Mig-7, 18S und GAPDH
- PCR-Abdeckfolie
- Pipette und Pipettenspitzen
- Zentrifuge
- PCR-Gerät

Die Plattenbelegung wurde schließlich mit den verwendeten Markern, Spikingmengen bzw. Patientenproben und der endogenen Kontrolle ins PCR-Notebook eingegeben. Für die Durchführung der PCR wurden pro cDNA-Probe 10 µl Master Mix (TaqMan® Fast Universal PCR MasterMIX), 1 µl Primer und 7 µl nuclease-freies Wasser vorbereitet. Die Wells wurden nun zügig mit jeweils 2 µl der cDNA versehen. Im Anschluss wurden jeweils 18 µl des vorbereiteten Mix in jedes cDNA beinhaltende Well pipettiert (somit insgesamt 18 µl „Mix“ und 2 µl cDNA pro Well). Luftblasen sollten hierbei stets vermieden werden. Im Anschluss wurde die Platte mit Adhesive Cover abgedeckt und dieses angeedrückt. Um sicherzustellen, dass sich jeweils die gesamte Menge der Reagenzien am Boden des Wells befand, wurde die vollendete Platte ca. 2 min bei 300xrpm ohne Bremse kurz zentrifugiert. Die PCR-Platte konnte nun in das PCR-Gerät geschoben und die PCR gestartet werden. Die nun ablaufenden Zyklen mit Temperatur und Dauer zeigt Tab. 3.

95°C/20 Sek.	
95°C/3 Sek. → 60°C/30 Sek.	40 Zyklen

Tabelle 3: Temperaturprotokoll der PCR

2.1.3.3 Auswertung der RT-PCR

Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Wie bereits beschrieben (vgl. 1.3) wurde zum Nachweis der DNA mit einer relativen Quantifizierung gearbeitet, in der die Genexpression eines Zielgens auf ein Referenzgen bzw. „Housekeeping Gen“ (GAPDH, 18S) bezogen wird. Dieser Mengenvergleich mit den Haushaltsgenen wird Normierung genannt. Die Menge an DNA und somit auch das Fluoreszenzsignal steigen mit zunehmenden Zyklen der Replikation. Es können Fluoreszenzkurven erstellt werden. Die DNA-Menge ist zu

Beginn gering (Startphase), verdoppelt sich im Idealfall in der exponentiellen Phase im Anschluss und stagniert schließlich in einer letzten Plateauphase. Die Stagnation kommt durch Hybridisierungen der entstandenen Fragmente der replizierten Zielsequenz zustande, welche eine weitere Vermehrung hemmen. Zusätzlich wurden bis zu diesem Zeitpunkt Substrate weitgehend verbraucht und die Polymerasen bzw. Nukleotide durch die Hitze zerstört. Die Quantifizierung betrachtet den Punkt der exponentiellen Phase an dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Der jeweilige Zyklus wird als CT-Wert (engl. Treshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus“) bezeichnet. Auch die Expression des Referenzgens wird auf diese Art und Weise ermittelt und mit der des Zielgens normiert. Die relative Expression des Zielgens wird auf eine Kontrollprobe bezogen [64, 111]. Um nun die sogenannte Ratio (den Unterschied in der Expression) zu berechnen, wird in einem ersten Schritt für jede Probe das CT Referenzgen vom CT Zielgen abgezogen, was ΔCT ergibt. Im Anschluss wird vom ΔCT der experimentell bearbeiteten Probe der ΔCT -Wert einer Kontrolle (in dieser Arbeit einer Probe mit 0 Tumorzellen bzw. von einer gesunden Spenderin) subtrahiert, es entsteht $\Delta\Delta CT$. Für die Berechnung des Expressionsunterschieds zwischen experimentell behandelter Probe und Kontrolle (Relative Quantifizierung, RQ) in Bezug auf ein Referenzgen wird der erhaltene $\Delta\Delta CT$ -Wert in die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ eingesetzt [74].

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Behandlung} - \Delta CT \text{ Kontrolle}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Ein RQ-Wert > 1 bedeutet eine Hochregulierung der Expression des Zielgens im Vergleich zur Negativprobe, während ein Wert < 1 dafür steht, dass eine geringere Genexpression gemessen wurde als in der Negativprobe [64, 74, 111]. Die Umwandlung der Fluoreszenzintensität in CT, ΔCT , $\Delta\Delta CT$ und schließlich RQ-Werte wurde mit der SDS Software ermittelt. Im Anschluss wurden sie in Microsoft® Excel™ übertragen. Mit Hilfe dieses Programms konnten aus den Werten entsprechende Graphen erstellt werden.

2.2 Zellkulturen

2.2.1 Zelllinien

Alle Zelllinien stammen von ATCC (American Type Culture Collection, Wesel, Deutschland). Zunächst wurde die Zellreihe HEC-1A (ATCC® HTB-112™) kultiviert und auf die Genexpression der ausgewählten Tumormarker getestet. HEC-1A wurde 1968 von Kuramoto et al. erstmals beschrieben, nachdem die Zellen von einer 71jährigen Patientin mit Endometriumkarzinom im Stadium IA isoliert worden waren [112-115]. Die Zellen stammen von einer Patientin mit endometroidem Adenokarzinom und sind epithelialen Ursprungs. Sie zeigen eine

mäßige Differenzierung [116]. Neben HEC-1A wurden auch Tumorzellen der Zellreihe RL95-2 (ATCC® CRL-1671™) untersucht. RL95-2 leitet sich von einem mäßig differenzierten adenosquämosen Endometriumkarzinom (Grad 2) ab. Die Zellen sind epitheloid [117]. Sie stammen von einer 65jährigen Patientin [118].

2.2.2 Kultivierung und Abnahme

Material:

- Zellkulturflaschen 75cm²
- Zellreihe HEC-1A bzw. RL95-2
- PBS-Lösung
- Dulbeccos MEM with stable glutamine
- FBS
- Antibiotikallösung (Penicillin-Streptomycin)
- Trypsin/EDTA-Lösung
- FALCON-Röhrchen
- elektrische Pipettierhilfe und sterile Pipetten (5ml und 10ml)
- Abfallbehältnis
- Sterilbank
- CO₂-Inkubator

Die Kultivierung erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Lieferanten (American Type Culture Collection, ATCC, Wesel, Deutschland, bzw. HTB-112 und CRL-1671). Die Zellkultur wurde zusammen mit dem Zellkulturmedium in Flaschen in einem CO₂-Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) aufbewahrt. Als Medium wurde Dulbeccos MEM (Modified Eagle Medium) versehen mit fetalem Kälberserum (FBS, Fetal bovine serum) und mit einer Antibiotika-Lösung (Penicillin-Streptomycin) verwendet. Um eine Kontamination zu vermeiden wurden die Arbeiten mit der Kultur stets in einer Sterilbank durchgeführt. Jeden dritten Tag erfolgten ein Austausch des Mediums sowie die Abnahme eines Teils der Zellen für die Spiking-Experimente. Es wurde darauf geachtet, dass sich lediglich die zur Kultivierung und Abnahme erforderlichen Reagenzien und Werkzeuge innerhalb der Sterilkammer befanden: Das verschlossene Kulturmedium, ein steriles PBS, ein Abfallbehältnis für das verbrauchte Medium, eine Trypsin/EDTA-Lösung in vorbereiteten FALCON-Röhrchen, beschriftete FALCON-Röhrchen für die Zelllinien, eine elektrische Pipettierhilfe und sterile Pipetten (5 ml und 10 ml). Bei der zweimal wöchentlichen Versorgung wurde zunächst das sich in den Flaschen befindliche Medium abgeschüttet und Reste mehrfach mit PBS gespült. Um die Zellen von der Flaschenwand zu lösen wurden 3 ml der Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben und die Kultur

erneut wenige Minuten in den Inkubator gestellt. Im Anschluss wurde die Kultur mit 8 ml frischem Medium versehen, kurz gespült, der Großteil der Flüssigkeit abgenommen und in die vorbereiteten FALCON-Röhrchen überführt. Vor der erneuten Inkubation im CO₂-Brutschrank wurde die verbleibende Kultur mit Nährmedium auf 10 ml frisches Medium aufgefüllt.

2.2.3 Zellzählung

Material:

- PBS-Lösung
- Trypan-Blau
- Zellmedium mit Zellen von HEC-1A bzw. RL95-2
- Neubauer-Zählkammer
- Well-Platte
- Pipette und Pipettenspitzen

Um die Anzahl der jeweiligen Tumorzellen zu ermitteln, wurden diese mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierfür wurden zunächst 50 µl PBS und 25 µl Trypan-Blau in eine Well-Platte pipettiert. Nach Vortexen der vorher abgenommenen Zellkulturen wurden 25 µl der Zellflüssigkeit (Medium mit den zu zählenden Zellen) in dasselbe Well überführt. 25 µl des entstandenen Gemischs wurden nun vorsichtig unter das Deckglas des Objektträgers (Neubauer-Zählkammer) pipettiert und anschließend im Lichtmikroskop angesehen. Mit Hilfe eines auf der Zählkammer befindlichen Gitters konnten nun die Zellen in jeweils vier Quadranten ausgezählt und addiert werden. Die Tumorzellen wurden hierbei durch ihren blauen Randsaum identifiziert. War nur eine geringe Anzahl an Zellen vorhanden oder die Verteilung auf dem Gitter sehr unregelmäßig wurden alle 20 Quadranten ausgezählt und das Ergebnis durch fünf dividiert. Die ermittelte Anzahl wurde mit 10⁵/ml multipliziert und ergab $Y \times 10^5$ Zellen pro Milliliter (entspricht Y Zellen pro Mikroliter). Im Anschluss konnte so die jeweils benötigte Menge an Zellflüssigkeit für die Spiking-Experimente berechnet werden.

2.3 Patientenproben

Nach dem positiven Ethikvotum (vgl. Anhang) konnten Blutproben von Patientinnen der Frauenklinik der LMU München Innenstadt abgenommen werden. Hierfür wurde zunächst das Einverständnis der Patientinnen eingeholt. Als Patientenproben diente das EDTA-Vollblut von 12 Patientinnen mit Endometriumkarzinom, davon eine Patientin vor und nach Chemotherapie (Nummer 2 bzw. 4). Im Folgenden werden die Patientinnen mit TNM-

Klassifikation, Grading und FIGO-Stadieneinteilung, Histologie ihres Tumors sowie ihrem menopausalen Status aufgeführt (vgl. Tab.4)

Nummer	Alter	T	N	M	Grading	FIGO	Histologie	Menopausenstatus
1	57	pT1a	Nx	M0	G1	IA	Endometrioides Adenokarzinom	postmenopausal
2	76	pT2	N0	M1	G2-3	IIB	Metastasiertes Adenokarzinom	postmenopausal
3	61	pT1a	N0	M0	G1	IA	Endometrioides Adenokarzinom	Klimakterium
4	76	pT2	N0	M1	G2-3	IIB	Metastasiertes Adenokarzinom	postmenopausal
5	54	pT1a	N0	Mx	G1	IA	Endometrioides Adenokarzinom Rezidiv	postmenopausal
6	32	pT1a	N0	Mx	G2	IA	Endometrioides Adenokarzinom	prämenopausal
7	58	pT2	N2 (7/18)	M0	G3	IIIC2	Klarzelliges Adenokarzinom	Klimakterium
8	58	pT1a	N0	M0	G1	IA	Endometrioides Adenokarzinom	postmenopausal
9	69	pT3a	N1 (1/18)	Mx	G3	IIIC	Seröses Adenokarzinom	postmenopausal
10	69	pT1a	N0	Mx	G1	IA	Endometrioides Adenokarzinom	postmenopausal
11	55	pT4b	pN2 (6/8)	M1	G2	IVB	Endometrioides Adenokarzinom	Klimakterium
12	53	pT1a	pN0	Mx	G1	IA	Endometrioides Adenokarzinom	postmenopausal
13	65	pT1a	pNx	Mx	G2	IA	Endometrioides Adenokarzinom	postmenopausal

Tabelle 4: Patientendaten

2.4 Methodisches Vorgehen

2.4.1 Spiking-Experimente

Als Vorversuche diente das Versehen von Blutproben gesunder Spender mit der durch Zellzählung (vgl. 2.2.3) ermittelten Anzahl an Tumorzellen, das sogenannte Spiking. Die Isolierung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben (vgl. 2.1.1). Eine der Proben wurde als Negativkontrolle verwendet und deswegen nicht mit Tumorzellen versehen. Zusätzlich wurde je eine Probe mit 10, 100 und 1000 Zellen pro Milliliter gespiket. Das Spiking wurde bei der RNA-Extraktion mit Trizol an Tag 1 durchgeführt (vgl. 2.1.2.1). Nach Zugabe von 1 ml Trizol auf das vorher hergestellte Zellpellet und Überführung in ein Eppendorfgefäß wurde die berechnete Menge an Tumorzellflüssigkeit zugegeben. Im Anschluss wurde weiter verfahren wie bereits dargelegt (vgl. 2.1.2.2 bis 2.1.3.3). Durch diese Methode konnte nach Durchführung der RT-PCR eine Beziehung zwischen vorher festgelegter Tumorzellzahl pro μl und der gemessenen Markerexpression festgestellt werden. Zeigte ein Marker eine Zunahme mit steigender Zellmenge, wurde er nach Beendigung der Spikingexperimente auf die Proben der Patientinnen mit Endometriumkarzinom übertragen (vgl. 2.4.3).

2.4.2 Mykoplasmentest

Eine Kontamination stellt eine der Hauptproblematiken der Zellkultur dar. Laut Uphoff et al. sind 15 bis 35 % aller humanen und tierischen Zellkulturen mit Mykoplasmen infiziert [119]. Bei Mykoplasmen handelt es sich um parasitäre Bakterien. Die Infektion der Kultur kann die Funktion, den Stoffwechsel und das Wachstum der Zellen beeinflussen, womit auch die Versuchsbedingungen beeinträchtigt werden [120]. Die Polymerase-Kettenreaktion ist auch hier eine schnelle und sensitive Methode zum Nachweis [121]. Nach Neubestellung der Zellreihe RL95-2 erfolgte vor Splitten und Einfrieren der Kultur ein Test auf Mykoplasmenbefall. Hierfür wurde ein Mycoplasma Test Kit der Firma AppliChem verwendet. Das Test Kit nutzt für den Nachweis der Mykoplasmen eine mykoplasmenspezifische 16S rRNA Gensequenz, welche zunächst amplifiziert und im Anschluss mit Hilfe einer Gelelektrophorese detektiert wird.

2.4.2.1 Probenaufbereitung

Material

- Zelllinie RL95-2
- Eppendorf-Tube
- Zentrifuge
- Puffer-Lösung
- Pipette und Pipettenspitzen

- Gefrierschrank -20°C

1 ml der Zellkultur wurden in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und dieses, um Zelltrümmer zu sedimentieren, zentrifugiert (1,6x1000rpm für 10 min). Nach Überführung des Überstands in ein steriles Eppendorf-Gefäß erfolgte eine erneute Zentrifugation (13,6x1000rpm für 10 min) mit dem Ziel die eventuell enthaltenen Mykoplasmen zu sedimentieren. Im Anschluss wurde der Überstand dekantiert, das entstandene Pellet mit 50 µl Puffer-Lösung resuspendiert und gut mit der Pipette vermischt. Die Proben wurden nun für drei Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.4.2.2 PCR-Amplifikation

Material:

- Eppendorf-Tubes
- Wasser
- Reaktionsmix
- Probe aus der Aufbereitung
- Positivkontrolle

Zur Amplifikation mit einer PCR wurden neben dem Mix der Probe (35 µl H₂O, 10 µl Reaktionsmix, 5 µl der aufbereiteten Probe) auch ein solcher für eine Positivkontrolle (39 µl H₂O, 10 µl Reaktionsmix, 1 µl Positivkontrolle) und eine H₂O-Kontrolle (40 µl H₂O, 10 µl Reaktionsmix) hergestellt. Der Ansatz erfolgte auf Eis wobei die Positivkontrolle zur Vermeidung einer Kontamination am Ende pipettiert wurde. Im Eppendorf-Cycler wurde das Programm „Myko“ ausgewählt, bestehend aus einem Startzyklus bei 94°C für 30 sek, 35 folgenden Zyklen (jeweils 94°C für 30 sek, 60°C für zwei min, 72°C für eine min) und drei abschließenden Zyklen (94°C für 30 sek, 60 °C für zwei min, 72°C für fünf min).

2.4.2.3 Gel-Elektrophorese

Material:

- 2 % Agarose-Gel
- Ladepuffer (Gel Loading Buffer)
- Marker VIII
- Wasser
- Probe aus der PCR-Amplifikation
- Positivkontrolle aus der PCR-Amplifikation
- Stromsupply

- Kamm
- Geldokumentationsgerät

Für die Elektrophorese wurde ein 2 % Agarose-Gel von Invitrogen, als Ladebuffer ein 10x Blue Juice Gel Loading Buffer von Invitrogen und ein Marker mit DNA-Längenstandard VIII (19- 1114bp, 50 µg) von Roche verwendet. Neben der Mischungen für Probe (2 µl Ladebuffer, 10 µl Probe), Positivkontrolle (2 µl Ladebuffer, 10 µl Positivkontrolle) und H₂O-Kontrolle (2 µl Ladebuffer, 10 µl H₂O-Kontrolle) wurde zusätzlich ein Marker zur Längenmessung (2 µl Ladebuffer, 0,6 µl Marker, 8,4 µl H₂O) angesetzt. Nach dem Einsetzen des Agarose-Gels in den Stromsupply und einem zweiminütigen Vorlauf mit Kamm wurde dieser entfernt und die mittleren Gel-Taschen mit jeweils 10 µl der Ansätze bestückt. Die Elektrophorese wurde 30 min durchgeführt und das Gel nach Abschluss mit Hilfe des Dokumentationsgerätes von Bio-rad und des Programms Quantity One ausgewertet.

2.4.3 Übertragung auf Patientinnen mit Endometriumkarzinom

Die oben beschriebene Methodik zur Isolierung und Mengenbestimmung der RNA und anschließenden Umschreibung in cDNA mit darauffolgender RT-PCR zur Quantifizierung (vgl. 2.1.1 bis 2.1.3) wurde im Anschluss an die Vorversuche auf die 13 Patientenproben angewandt. Hierbei wurde auf die Expression der Marker CK19, MAL2, CCNE2 und Mig-7 getestet. (vgl. 3.1).

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Spiking-Experimente

3.1.1 Konzentrationen und Ratios der extrahierten RNA

Unter Spiking wird in dieser Arbeit das Hinzufügen von Tumorzellen zu Blutproben gesunder Spenderinnen verstanden. Es wurden stets eine Negativprobe ohne Spiking und jeweils eine Probe mit 10, 100 und 1000 Zellen/ml untersucht. Die Zugabe erfolgte im Rahmen der RNA-Extraktion mit Trizol an Tag 1 (vgl. 2.1.1 und 2.4.1). Konzentrationen und Ratios der RNA aus den mit Tumorzellen versehenen (gespikten) Blutproben wurden mit Hilfe des Nanophotometers ermittelt und anschließend in für die PCR notwendige cDNA umgeschrieben. Die Ratio der Absorption $A_{260/280}$ sollte hier stets ca. zwischen 1,7 und 1,9 betragen, um die geforderte Reinheit zu gewährleisten. Über ausreichende Konzentration und Ratio für die Umschreibung verfügten die gespikten Blutproben für vier PCR-Platten. Hiervon wurden jeweils zwei Platten mit steigender Anzahl an HEC-1A-Zellen (Platte 1 und 2) und zwei Platten mit RL-95-2-Zellen gespikt (Platte 3 und 4). Die gemessenen Werte sind in Tabelle 5 veranschaulicht.

Zelllinie HEC1A: Spiking für PCR-Platte 1		
Zellzahl (n/ml)	Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Ratio
0	0,652	1,884
10	0,776	1,848
100	0,774	1,927
1000	0,454	1,707
Zelllinie HEC1A: Spiking für PCR-Platte 2		
Zellzahl (n/ml)	Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Ratio
0	0,760	1,91
10	0,546	1,923
100	0,432	1,964
1000	0,832	1,817
Zelllinie RL95-2: Spiking für PCR-Platte 3		
Zellzahl (n/ml)	Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Ratio
0	0,448	1,982
10	0,382	1,929
100	0,426	1,885
1000	0,730	1,881
Zelllinie RL95-2: Spiking für PCR-Platte 4		
Zellzahl (n/ml)	Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Ratio
0	1,156	1,986
10	1,458	2,009
100	1,33	2,04
1000	1,418	2,008

Tabelle 5: Konzentrationen und Ratios der Spiking-RNA

3.1.2 Genexpressionswerte aus der RT-PCR der Spiking-Experimente

Im Anschluss an die Bestimmung von Konzentration und Ratio erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA mit Hilfe der reversen Transkription. Die gewonnene cDNA wurde der RT-PCR zugeführt. 18S wurde stets als Referenzgen verwendet und eine Negativkontrolle in Form der jeweiligen Nullprobe (d.h. ohne Hinzufügen von Tumorzellen/Spiking) untersucht. Mit der RT-PCR wurden die CT-Werte ermittelt, woraus die relative Quantifizierung RQ als Maß für die Expression der jeweiligen Marker berechnet werden konnte. Bei einem geeigneten Marker sollten sich mit ansteigender zugeführter Tumorzellzahl/ml (von 0 auf 10, von 10 auf 100, von 100 auf 1000 Zellen/ml) abnehmende CT-Werte zeigen, da dies bedeutet der Schwellenwert CT wurde früher erreicht. Im Gegenzug sollten die RQ-Werte mit zunehmenden Tumorzellen in den Blutproben ansteigen und stets >1 sein. Werte >1 signalisieren eine höhere Genexpression des Markers als in der Negativprobe.

Zu Beginn wurden als Housekeepinggene sowohl 18S als auch GAPDH verwendet. Diese dienten folglich als Referenz. Da sich in den ersten beiden PCR-Platten mit HEC-1A 18S als

die deutlich bessere Referenz erwiesen hatte (geringere Werte für CT und damit höhere Expression, vgl. Tab. 6 und 7), wurde in den darauffolgenden Untersuchungen von RL95-2 auf GAPDH als zusätzliches Haushaltsgen verzichtet und alleine auf 18S bezogen. Die Werte für CT von 18S und GAPDH zeigen die folgenden beiden Tabellen (vgl. Tab. 6 und 7).

HEC-1A: Platte 1		
Zellzahl (n/ml)	Referenz	Ct
0	18S	13.000
0	18S	12.599
10	18S	12.256
10	18S	12.311
100	18S	14.525
100	18S	14.556
1000	18S	15.135
1000	18S	15.288
HEC-1A: Platte 2		
Zellzahl (n/ml)	Referenz	Ct
0	18S	10.659
0	18S	10.897
10	18S	13.000
10	18S	11.075
100	18S	11.747
100	18S	12.040
1000	18S	8.820
1000	18S	9.757
RL95-2: Platte 3		
Zellzahl (n/ml)	Referenz	Ct
0	18S	13.305
0	18S	13.293
10	18S	12.351
10	18S	12.261
100	18S	15.000
100	18S	14.430
1000	18S	14.278
1000	18S	14.233
RL95-2: Platte 4		
Zellzahl (n/ml)	Referenz	Ct
0	18S	14.313
0	18S	14.477
10	18S	15.000
10	18S	14.673
100	18S	15.197
100	18S	15.220
1000	18S	14.569
1000	18S	14.330

Tabelle 6: Daten RT-PCR für 18S

HEC-1A: Platte 1		
Zellzahl (n/ml)	Referenz	Ct
0	GAPDH	18.928
0	GAPDH	19.067
10	GAPDH	19.000
10	GAPDH	19.538
100	GAPDH	20.366
100	GAPDH	20.414
1000	GAPDH	19.719
1000	GAPDH	19.480
HEC-1A: Platte 2		
Zellzahl (n/ml)	Referenz	Ct
0	GAPDH	19.653
0	GAPDH	19.422
10	GAPDH	20.228
10	GAPDH	19.513
100	GAPDH	20.602
100	GAPDH	21.000
1000	GAPDH	20.166
1000	GAPDH	20.346

Tabelle 7: Daten RT-PCR für GAPDH

3.1.2.1 Ergebnisse für CK20

CK20 als Marker zeigte bei allen PCR-Durchgängen keinen kontinuierlichen Anstieg der Genexpression (ausgedrückt durch den Anstieg des Werts für die relative Quantifizierung RQ) bzw. wurde oftmals erst in späten Zyklen oder sogar überhaupt nicht detektiert. Die RQ < 1 bedeuten hier wiederum, dass die Markerexpression geringer ausgeprägt ist als in der Nullprobe ohne Zellzugabe. Teilweise konnte für die Negativprobe kein CT ermittelt und folglich auch kein RQ für die gespikten Proben berechnet werden (vgl. Tabelle 8: Daten RT-PCR für CK20: Platte 2, 3 und 4). Es ließen sich keine ansteigenden Kurven der relativen Quantifizierung RQ für CK20 erstellen.

HEC-1A: Platte 1	Marker CK20	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	Undet.	1.000
0	37.647	1.000
10	39.294	0.223
10	Undet.	0.223
100	34.726	16.279
100	36.000	16.279
1000	33.193	111.474
1000	33.325	111.474

RL95-2: Platte 3	Marker CK20	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	Undet.	
0	Undet.	
10	Undet.	
10	Undet.	
100	39.751	
100	Undet.	
1000	34.000	
1000	33.437	

HEC-1A: Platte 2	Marker CK20	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	Undet.	
0	Undet.	
10	39.942	
10	Undet.	
100	Undet.	
100	39.417	
1000	34.717	
1000	34.728	

RL95-2: Platte 4	Marker CK20	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	Undet.	
0	Undet.	
10	Undet.	
10	Undet.	
100	Undet.	
100	Undet.	
1000	Undet.	
1000	Undet.	

Tabelle 8: Daten RT-PCR für CK20

Im Folgenden werden die CT-Werte von CCNE2, MAL2, CK19 und Mig-7 in den einzelnen Zyklen bei steigender zugeführter Zellzahl (0, 10, 100 und 1000 Zellen/ml) veranschaulicht. Sie werden in Amplifikationskurven dargestellt, die mit Hilfe der PCR-Software angefertigt wurden. Für jedes Gen wurde für eine PCR-Platte eine Amplifikationskurve erstellt. In Tabellen werden zusätzlich die CT- und RQ-Werte für jeden Marker aus den vier PCR-Durchgängen (zwei mit der Zelllinie HEC-1A und zwei mit der Zelllinie RL95-2) aufgeführt. Basierend auf den PCR-Daten (Tab. 9 - Tab. 12) konnten für diese vier Biomarker Kurven der relativen Quantifizierung (RQ) erstellt werden.

3.1.2.2 Ergebnisse für CCNE2

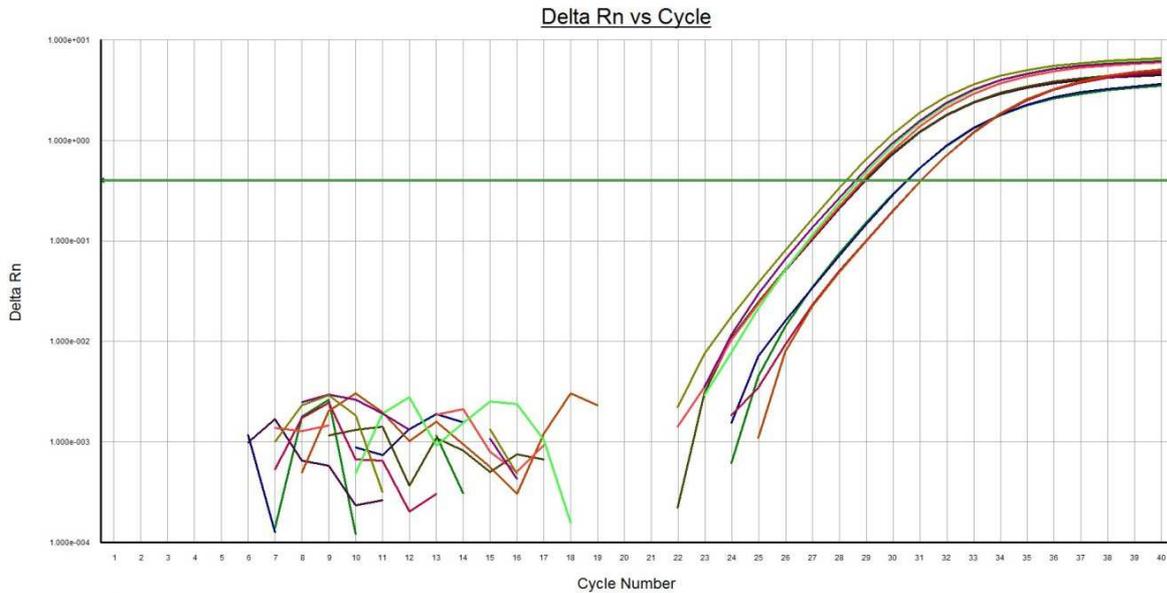


Abbildung 5: Amplifikationskurve von CCNE2 (Platte 1, HEC-1A)

HEC-1A: Platte 1	Marker CCNE2	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	30.469	1.000
0	30.477	1.000
10	29.000	1.979
10	28.945	1.979
100	31.052	2.236
100	31.054	2.236
1000	28.865	17.259
1000	28.686	17.259

RL95-2: Platte 3	Marker CCNE2	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	30.991	1.000
0	30.963	1.000
10	29.691	1.052
10	30.131	1.052
100	36.000	0.093
100	35.651	0.093
1000	28.066	12.123
1000	28.602	12.123

HEC-1A: Platte 2	Marker CCNE2	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	28.666	1.000
0	29.042	1.000
10	28.761	1.072
10	29.413	1.072
100	29.976	0.773
100	31.000	0.773
1000	29.065	2.024
1000	28.047	2.024

RL95-2: Platte 4	Marker CCNE2	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	31.000	1.000
0	30.558	1.000
10	30.859	1.206
10	31.042	1.206
100	32.104	0.776
100	31.812	0.776
1000	30.510	1.186
1000	30.664	1.186

Tabelle 9: Daten RT-PCR für CCNE2

CCNE2 verzeichnete die höchsten Werte für RQ bei Platte 1 (Zellreihe HEC-1A). In den anderen Durchgängen kam es teilweise zu einer Herabregulierung mit Werten < 1 (z.B. RQ= 0,093 bei Platte 3 bei Zugabe von 100 Zellen/ml, vgl. Tab. 9) oder zu einzelnen „Ausreißern“, die einen stetigen Anstieg durchbrachen (vgl. Tab. 9: Platte 2 und 3: Abfall von 10 Zellen/ml

auf 100 Zellen/ml). Für die relative Quantifizierung als Maß der steigenden Genexpression von CCNE2 bei zunehmender Tumorzellzahl konnte für Platte 1 eine Kurve erstellt werden:

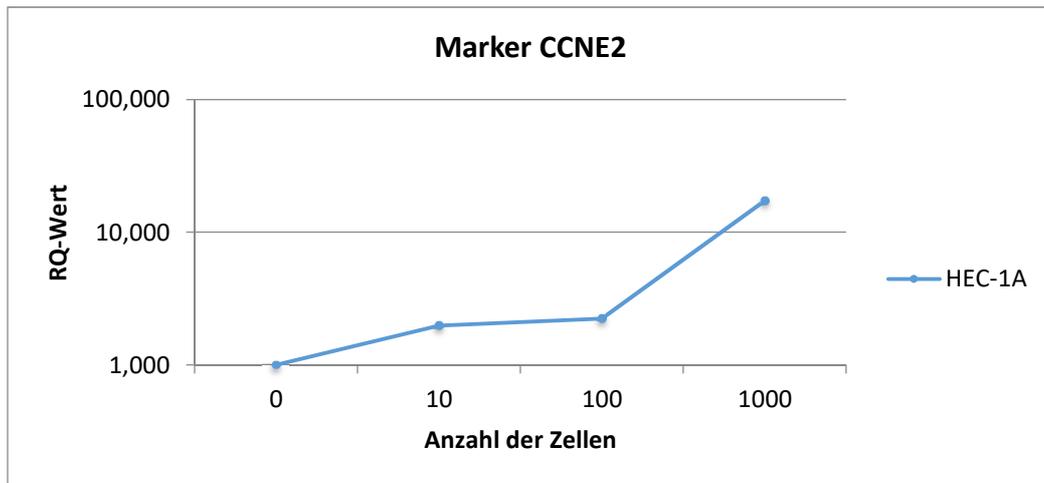


Abbildung 6: Kurve der relativen Quantifizierung für CCNE2

Hier wird verdeutlicht, dass der größte Zuwachs bei der Zugabe von 1000 Zellen verzeichnet werden konnte: Mit einem RQ-Sprung von 2,236 auf 17,259 zeigte sich die Kurve am steilsten (vgl. Abb. 6).

3.1.2.3 Ergebnisse für MAL2

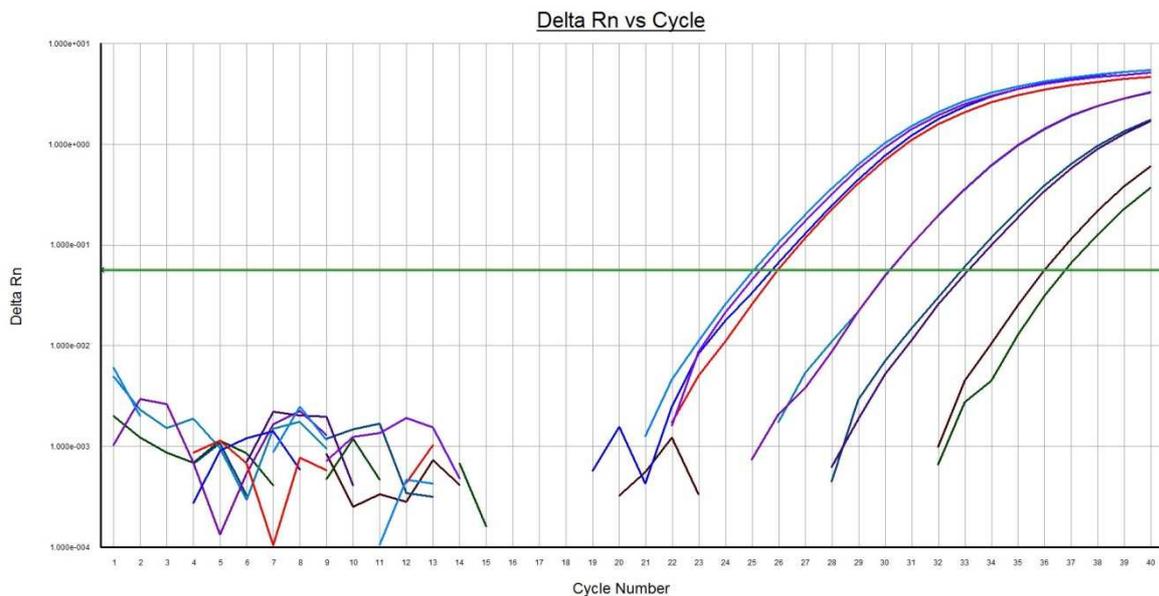


Abbildung 7: Amplifikationskurve von MAL2 (Platte 1, HEC-1A)

HEC-1A: Platte 1	Marker MAL2	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	36.000	1.000
0	36.718	1.000
10	32.857	7.262
10	33.109	7.262
100	30.130	249.744
100	30.141	249.744
1000	25.696	7.840.197
1000	25.973	7.840.197

RL95-2: Platte 3	Marker MAL2	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	Undet.	1.000
0	38.562	1.000
10	32.038	39.270
10	32.509	39.270
100	38.546	6.521
100	36.000	6.521
1000	26.713	8.372.034
1000	26.263	8.372.034

HEC-1A: Platte 2	Marker MAL2	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	36.429	1.000
0	36.000	1.000
10	34.458	6.460
10	33.254	6.460
100	32.656	34.568
100	32.078	34.568
1000	28.225	415.359
1000	28.246	415.359

RL95-2: Platte 4	Marker MAL2	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	35.631	1.000
0	35.684	1.000
10	34.255	1.961
10	36.000	1.961
100	32.669	16.489
100	32.185	16.489
1000	28.245	159.757
1000	28.539	159.757

Tabelle 10: Daten RT-PCR für MAL2

Die größte Zunahme der Genexpression konnte bei MAL2 beobachtet werden. Sowohl bei beiden HEC-1A-Platten als auch bei einer RL95-2-Platte zeigte sich ein steiler Anstieg der RQ-Werte. Bei Platte 3 (RL95-2) kam es zu einem einzelnen „Ausreißer“ bei 100 Zellen/ml, bei sonst sehr hohen Expressionswerten (vgl. Tab.10). Es konnten folglich drei Kurven erstellt werden (vgl. Abb.8). Bei beiden Zelllinien konnten mit 7840,97 bzw. 159,757 bei 1000 Zellen/ml die höchsten RQ-Werte verzeichnet werden (vgl. Tab.10)

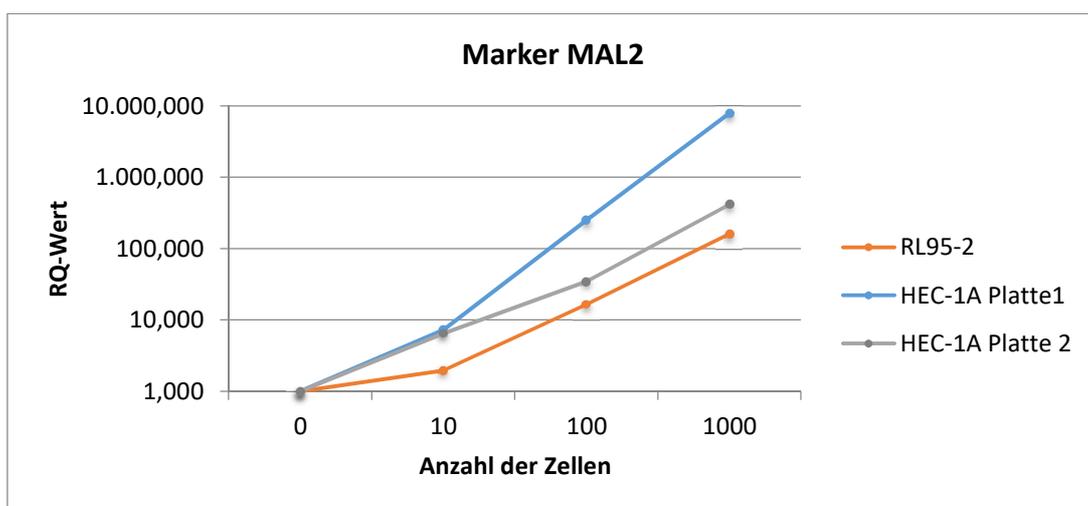


Abbildung 8: Kurve der relativen Quantifizierung für MAL2

3.1.2.4 Ergebnisse für CK19

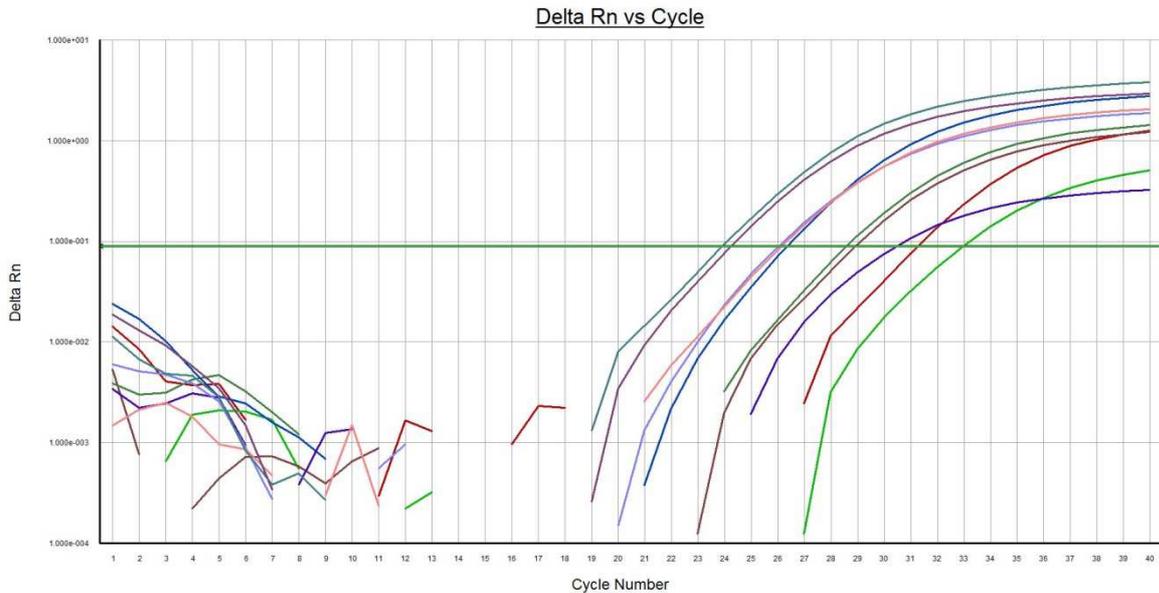


Abbildung 9: Amplifikationskurve von CK19 (Platte 2, HEC-1A)

Während die Platten 1 und 4 für CK19 zahlreiche RQ-Werte < 1 aufwiesen, zeigten sowohl Platte 2 mit HEC-1A als auch Platte 3 mit RL95-2 eine stetig steigende Genexpression (vgl. Tab. 11).

HEC-1A: Platte 1	Marker CK19	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	28.214	1.000
0	27.955	1.000
10	29.495	0.259
10	29.546	0.259
100	31.119	0.425
100	31.000	0.425
1000	27.131	10.288
1000	27.137	10.288

RL95-2: Platte 3	Marker CK19	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	31.728	1.000
0	31.766	1.000
10	28.717	5.213
10	28.026	5.213
100	28.251	32.834
100	28.000	32.834
1000	27.824	34.825
1000	27.340	34.825

HEC-1A: Platte 2	Marker CK19	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	31.242	1.000
0	33.000	1.000
10	28.951	12.977
10	28.561	12.977
100	26.330	31.505
100	30.485	31.505
1000	26.063	106.325
1000	26.153	106.325

RL95-2: Platte 4	Marker CK19	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	25.190	1.000
0	24.999	1.000
10	27.875	0.209
10	27.717	0.209
100	30.000	0.063
100	29.784	0.063
1000	29.561	0.046
1000	29.595	0.046

Tabelle 11: Daten RT-PCR für CK19

Es ließen sich für beide Zelllinien Kurven mit ansteigendem RQ bei zunehmender Zellzahl erstellen. HEC-1A ergab eine eher linear ansteigende Kurve, bei RL95-2 kam es bei Zugabe von 100 Zellen zu einem drastischen Anstieg von 5,213 auf 32,834 (vgl. Abb.10).

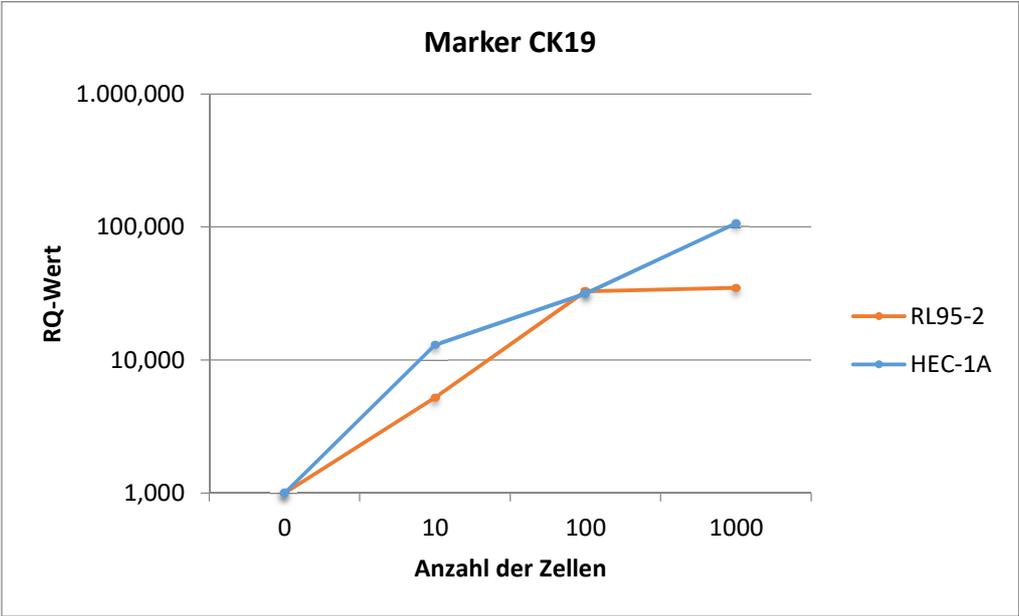


Abbildung 10: Kurve der relativen Quantifizierung für CK19

3.1.2.5 Ergebnisse für Mig-7

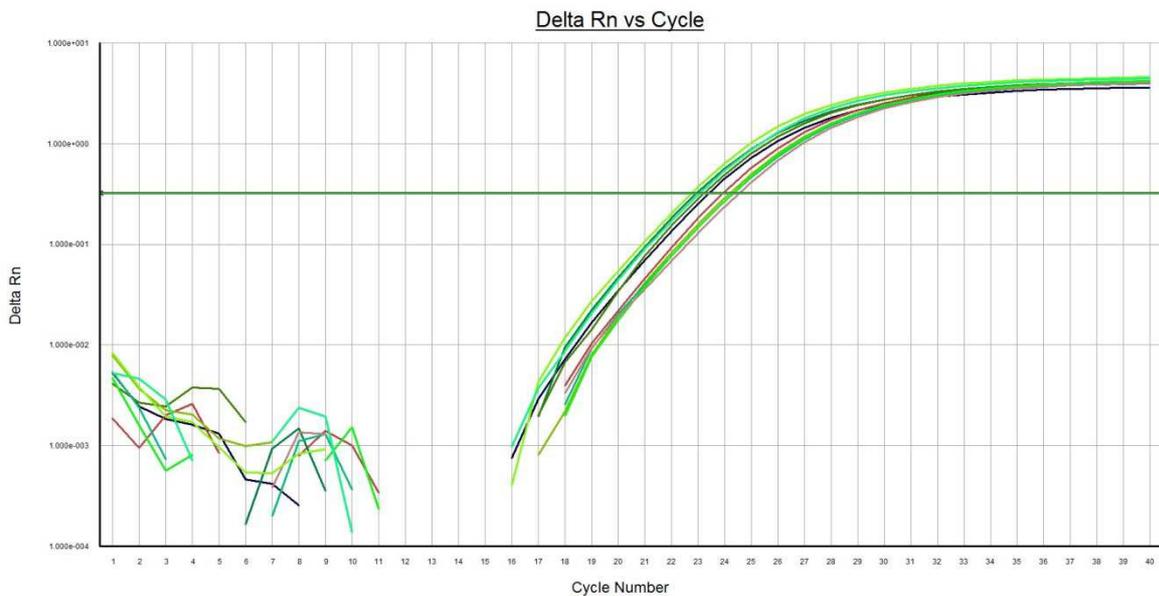


Abbildung 11: Amplifikationskurve von Mig-7 (Platte 1, HEC-1A)

HEC-1A: Platte 1	Marker Mig-7	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	23.397	1.000
0	23.985	1.000
10	23.000	1.045
10	23.226	1.045
100	24.211	2.244
100	24.321	2.244
1000	24.311	3.211
1000	24.530	3.211

RL95-2: Platte 3	Marker Mig-7	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	23.399	1.000
0	24.460	1.000
10	23.159	0.802
10	23.351	0.802
100	26.297	0.287
100	28.000	0.287
1000	23.772	2.887
1000	22.942	2.887

HEC-1A: Platte 2	Marker Mig-7	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	24.766	1.000
0	24.364	1.000
10	24.883	0.970
10	25.000	0.970
100	25.431	1.669
100	24.748	1.669
1000	24.146	2.166
1000	24.192	2.166

RL95-2: Platte 4	Marker Mig-7	
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	24.303	1.000
0	23.941	1.000
10	25.909	0.425
10	25.689	0.425
100	27.000	0.258
100	26.784	0.258
1000	26.454	0.209
1000	26.412	0.209

Tabelle 12: Daten RT-PCR für Mig-7

Mig-7 konnte lediglich in Platte 1 (HEC-1A) mit steigendem RQ detektiert werden. Bei den sonstigen PCR-Durchgängen wurden oftmals Werte < 1 gemessen. Es erzielte mit maximal 3,211 bei 1000 Zellen/ml in Platte 1 geringere RQ-Werte als die anderen untersuchten Marker (vgl. Tab.12). Darauf aufbauend wurde für Mig-7 eine Kurve für HEC-1A erstellt. Diese

verzeichnete zunächst einen nur sehr geringen Anstieg von 10 auf 100 Zellen/ml, verlief dann aber annähernd linear (vgl. Abb.12).

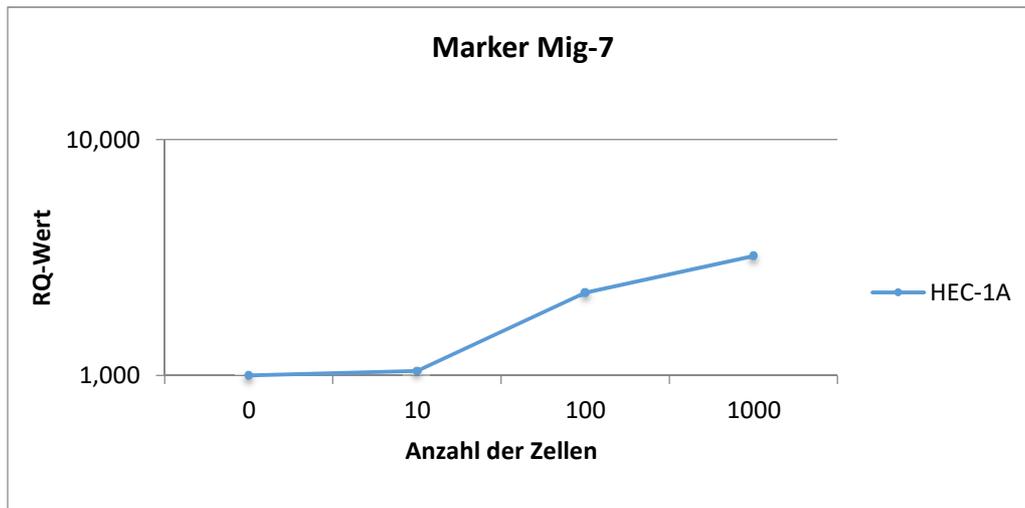


Abbildung 12: Kurve der relativen Quantifizierung für Mig-7

Die Abbildung 13 und Abbildung 14 zeigen eine Übersicht der Genexpression in den gespikten Blutproben für die Marker MAL2, CCNE2, CK19 und Mig-7 bei der Zelllinie HEC-1A. Sie machen deutlich, dass sich in den Spiking-Experimenten MAL2 als der Tumormarker mit dem steilsten Anstieg von RQ bei zunehmender Zellzahl erwiesen hat.

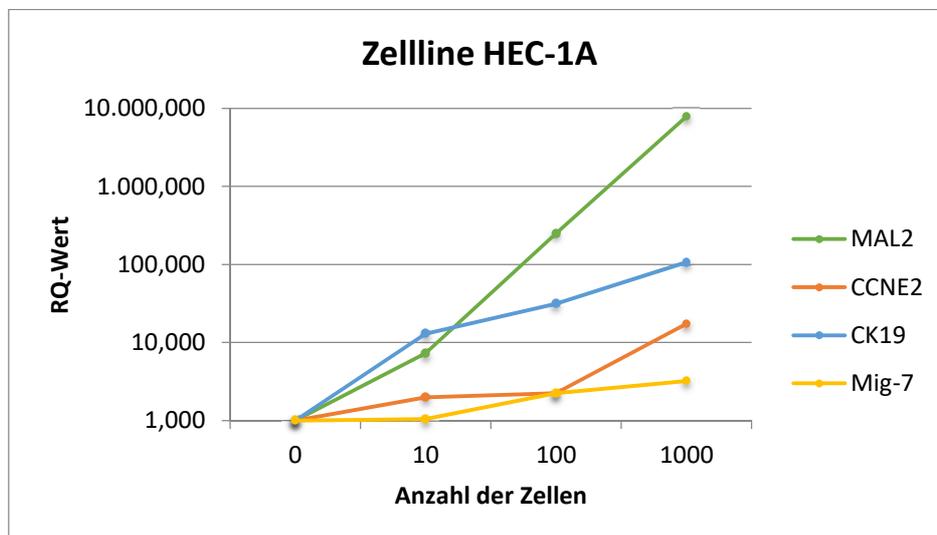


Abbildung 13: Kurven der relativen Quantifizierung der Tumormarker für HEC-1A-Zellen

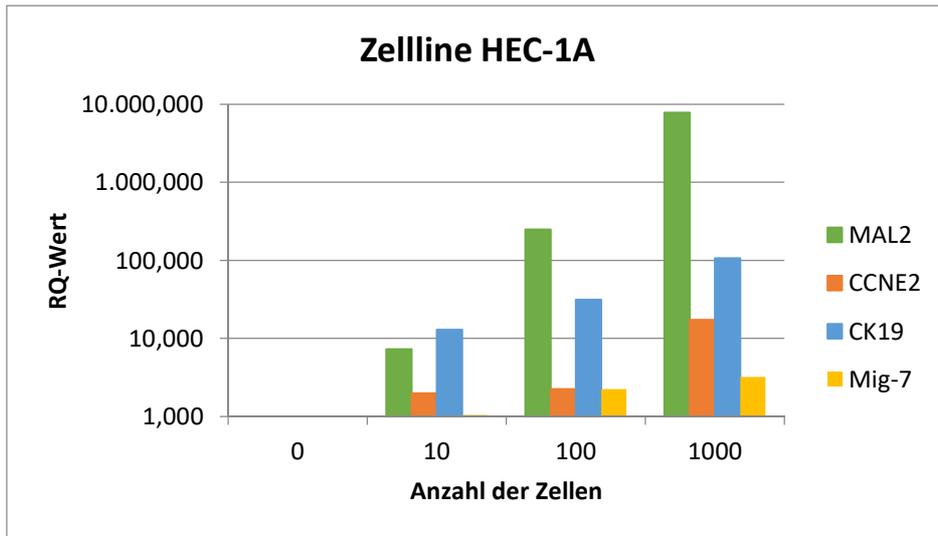


Abbildung 14: Säulen der relativen Quantifizierung der Tumormarker für HEC-1A-Zellen

In den Abbildungen 15 und 16 werden MAL2 und CK19 hinsichtlich ihrer Expression bei den RL95-2-Zellen verglichen. Auch bei Untersuchung dieser Zellreihe konnten für MAL2 die höchsten RQ-Werte gemessen werden, die Kurve für CK19 zeigt einen deutlich flacheren Verlauf (vgl. Abb. 15 und 16).

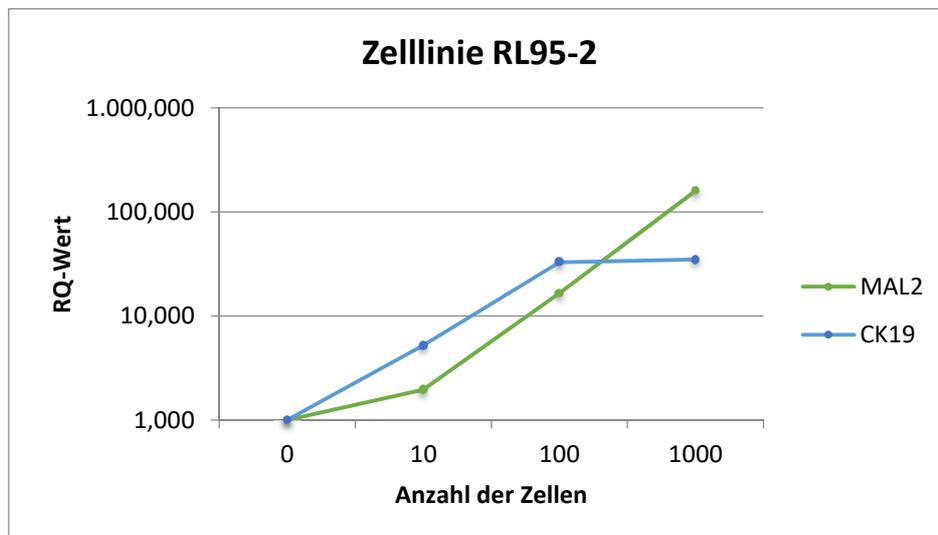


Abbildung 15: Kurven der relativen Quantifizierung der Tumormarker für RL95-2-Zellen

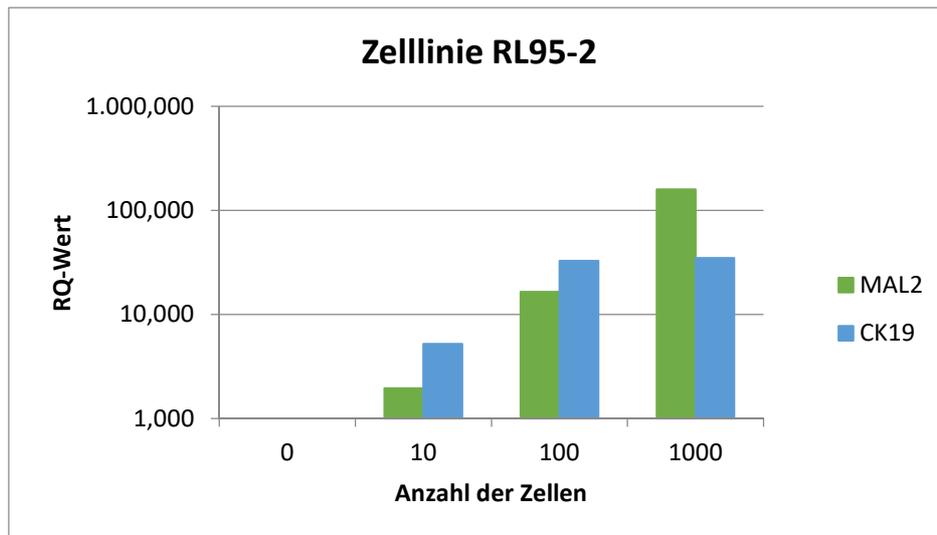


Abbildung 16: Säulen der relativen Quantifizierung der Tumormarker für RL95-2-Zellen

Zusammenfassend erwies sich MAL2 als der beste Marker in den Spiking-Experimenten. In drei von vier PCR-Durchgängen zeigten sich mit ansteigender Zellzahl/ml auch ansteigende Werte der Relativen Quantifizierung RQ. Auch für CK19 konnte sowohl für eine PCR-Platte HEC-1A als auch für eine Platte mit der Zelllinie RL95-2 eine Zunahme der Genexpression verzeichnet werden. CCNE2 und Mig-7 zeigten nur für Platte 1 der Zelllinie HEC-1A einen stetigen Anstieg ihrer Expression. Mig-7 wies hierbei die geringsten Werte für RQ auf. Mit Hilfe dieser Ergebnisse wurde im Anschluss entschieden, welche Tumormarker bezüglich ihrer Genexpression in Patientenproben weiter untersucht werden sollten. Aufgrund der mangelhaften Detektion von CK20, wurde dieser Marker nicht auf die weiteren Versuche übertragen. MAL2, CCNE2, CK19 und Mig-7 sollten mit Hilfe der RT-PCR auch im Blut der Patientinnen mit Endometriumkarzinom detektiert werden.

3.2 Mykoplasmentest

Um einen Mykoplasmenbefall der neu bestellten Zellreihe RL95-2 auszuschließen, wurde eine Testung diesbezüglich durchgeführt. Hierfür wurde mit Hilfe des Mycoplasma Test Kit von AppliChem eine spezifische Gensequenz amplifiziert und durch Gelelektrophorese detektiert (vgl. 2.4.2). Die elektrophoretische Auftrennung von der Probe aus der Zellkultur (Tasche 7), der Positivkontrolle (Tasche 6) und der H₂O-Kontrolle (Tasche 8) nach Auftragen auf Agarosegel diente zur Auswertung der zuvor durchgeführten PCR-Amplifikation (siehe Abb.17). Wie auf der Abbildung sichtbar zeigten sich für Probe und H₂O-Kontrolle Banden auf selber Höhe, die sich deutlich von der Höhe der Bande der Positivkontrolle unterschieden. Somit konnte in der untersuchten Probe und damit in der gesamten Zellreihe RL95-2 keine Kontamination mit Mykoplasmen nachgewiesen werden.

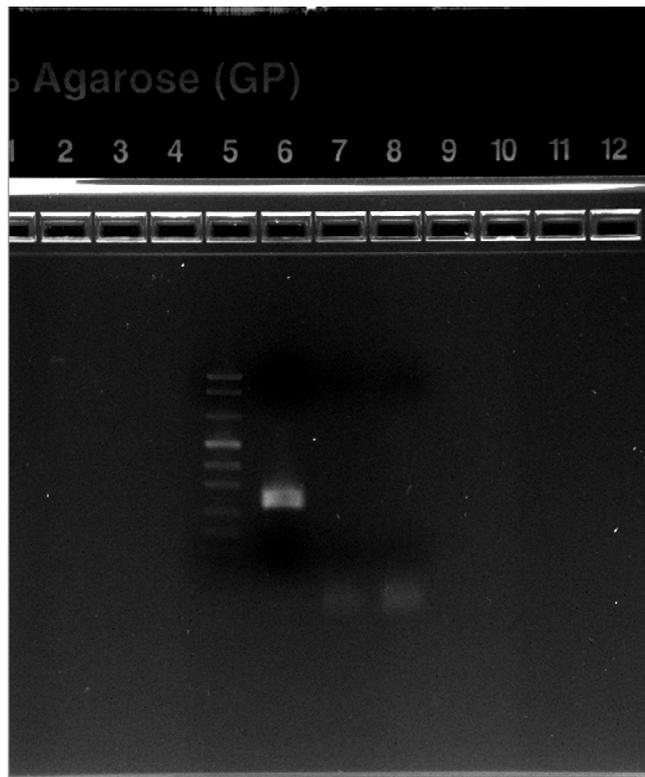


Abbildung 17: Screenshot Programm Quantity One Myco_Test

3.3 Ergebnisse bei Testung der Patientenproben

3.3.1 Konzentrationen und Ratios der extrahierten Patienten-RNA

Auch die aus den Patientenblutproben gewonnene RNA wurde auf ihre Konzentration und Ratio untersucht. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle EDTA-Blut einer gesunden Spenderin verwendet. Im Anschluss erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA und die RT-PCR wurde mit derselben Methodik wie die Spiking-Experimente zuvor durchgeführt. Anstatt Tumorzellen in aufsteigender Menge zuzugeben (Spiking) wurden die reinen Patientenblutproben untersucht. Die folgende Tabelle zeigt die gemessenen Werte für Konzentration und Ratio.

Probennr.	Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Ratio
Pat. 1	0,288	1,92
Pat. 2	0,78	1,921
Pat. 3	0,638	2,681
Pat. 4	0,416	1,793
Pat. 5	0,766	1,887
Pat. 6	0,644	1,988
Pat. 7	0,202	1,772
Pat. 8	0,324	1,67
Pat. 9	0,444	1,947
Pat. 10	0,462	1,863
Pat. 11	0,96	2,051
Pat. 12	0,98	1,914
Pat. 13	0,58	1,959
Negativkontrolle	1,16	1,986

Tabelle 13: Konzentrationen und Ratios der Patienten-RNA

3.3.2 Ermittelte RT-PCR-Ergebnisse aus den Patientenversuchen

Die aus den Patientenproben gewonnene cDNA zusammen mit der Negativkontrolle wurde im Anschluss auf die Genexpression der Marker MAL2, CCNE2, CK19 und Mig-7 untersucht. Auch bei diesen Versuchen wurde 18S als Referenzgen verwendet, das sich in den Spiking-Experimenten als geeignet erwiesen hatte. Die folgenden Tabellen zeigen die Auflistung der Patienten und ihrer RQ-Werte für den jeweiligen Marker in absteigender Reihenfolge. Die Abkürzung „Undet.“ steht für undetermined (engl. für unbestimmt) und bedeutet hierbei, dass ein Marker nicht detektiert werden konnte.

MAL2		
Patient	AvgCt	RQ
Pat.6	34.844	0.676
Pat.9	37.152	0.284
Pat.1	Undet.	Undet.
Pat.2	Undet.	Undet.
Pat.3	Undet.	Undet.
Pat.4	Undet.	Undet.
Pat.5	Undet.	Undet.
Pat.7	Undet.	Undet.
Pat.8	Undet.	Undet.
Pat.10	Undet.	Undet.

Tabelle 14: Relative Quantifizierung von MAL2 in Patientenproben

MAL2 wurde stets erst in späten PCR-Zyklen oder nicht detektiert. Obwohl sich dieser Marker in den Spiking-Experimenten als der mit dem jeweils steilsten und größten Zuwachs erwiesen hatte, konnte er bei den Patientenproben nur in geringen Mengen bzw. zum Teil nicht nachgewiesen werden.

CCNE2		
Patient	AvgCt	RQ
Pat. 6	27.992	1.315
Pat. 9	29.662	0.858
Pat. 10	33.353	0.252
Pat. 2	33.872	0.219
Pat. 7	39.425	0.072
Pat. 1	38.113	0.027
Pat. 4	37.855	0.021
Pat. 5	36.201	0.019
Pat. 3	Undet.	Undet.
Pat. 8	Undet.	Undet.

Tabelle 15: Relative Quantifizierung von CCNE2 in Patientenproben

Auch CCNE2 wurde in zwei Patientenproben (Pat. 3 und Pat. 8) nicht detektiert, in den übrigen verzeichnete der RQ-Wert bis auf Pat. 6 mit 1,315 stets Werte < 1 und war folglich herabreguliert (vgl. Tab. 15). Wegen der niedrigen RQ-Werte und mangelhaften Detektion bei Pat. 1 bis einschließlich Pat. 10 wurde bei den Patientenproben Pat. 11, Pat. 12 und Pat. 13 auf die Untersuchung der Expression von MAL2 und CCNE2 verzichtet und ausschließlich auf CK19 und Mig-7 getestet.

Mig-7		
Patient	AvgCt	RQ
Pat. 8	25.670	404.101
Pat. 12	25.009	215.731
Pat. 11	26.278	165.221
Pat. 3	28.104	73.720
Pat. 7	26.615	6.134
Pat. 2	27.365	1.297
Pat. 1	28.618	1.283
Pat. 13	24.134	1.192
Pat. 6	22.277	0.820
Pat. 10	32.303	0.820
Pat. 4	29.498	0.452
Pat. 5	28.105	0.335
Pat. 9	28.319	0.026

Tabelle 16: Relative Quantifizierung von Mig-7 in Patientenproben

Für Mig-7 konnten bei vier Patientinnen (Pat. 8, Pat. 12, Pat. 11 und Pat. 3) sehr hohe Werte für RQ und damit eine hohe Expression des Markers festgestellt werden (vgl. Tab.16). Eine Übersicht der Patientinneneigenschaften vgl. Tabelle 4 und 18. Bei drei dieser Patientinnen (Pat. 8, Pat. 12 und Pat. 3) handelte es sich um Tumore im Frühstadium: Nach Einstufung mit der TNM-Klassifikation ergab sich pTa N0 M0/x, das Grading war G1, FIGO Stadium IA wurde festgestellt. Es handelte sich bei allen drei um Primärfälle eines endometroiden Adenokarzinoms, zwei davon traten in der Postmenopause auf (Pat. 8 und Pat. 12), ein Tumor wurde im Klimakterium festgestellt (Pat. 3). Die Patientin Pat. 11 wies mit einer RQ von 165,221 den drittgrößten Wert für Mig-7 auf. In diesem Fall litt die Patientin unter einem bereits sehr großen endometroiden Adenokarzinom (pT4b) mit sowohl Lymphknoten- als auch Fernmetastasen (pN2 (6/8) M1), FIGO-Stadium IVB. Mit einem Grading von G2 war das Gewebe nur noch mäßig differenziert. Die restlichen Patientinnen (Pat. 1 und Pat. 2, Pat. 4 bis Pat. 7, Pat. 9, Pat. 10, Pat. 12 und Pat. 13) wiesen deutlich niedrigere Werte für RQ auf. Bei ihnen handelte es sich überwiegend um „Intermediärstadien“, d.h. die Tumore waren im Vergleich von mittlerer Größe (pT2, pT3a) im FIGO Stadium IIB/IIIC2. Sowohl das klarzellige (Pat. 7) als auch das seröse Adenokarzinom (Pat. 9) befanden sich darunter. Die mit zwei Blutproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersuchte Patientin verzeichnete nach ihrer Chemotherapie (Pat. 4) einen Abfall des RQ-Werts auf 0,452 im Vergleich zu einem RQ von 1,297 vor ihrer Behandlung (Pat. 2) (vgl. Tab. 16).

CK19		
Patient	AvgCt	RQ
Pat. 12	26.970	16.798.969
Pat. 11	29.772	7.969.585
Pat. 8	27.883	168.100
Pat. 3	29.447	44.902
Pat. 13	26.954	15.692
Pat. 2	26.764	3.041
Pat. 7	29.235	1.925
Pat. 4	29.358	0.769
Pat. 10	26.503	0.666
Pat. 1	29.856	0.666
Pat. 5	29.431	0.206
Pat. 9	28.624	0.040
Pat. 6	31.179	0.003

Tabelle 17: Relative Quantifizierung von CK19 in Patientenproben

Die höchsten RQ-Werte und damit die größte Expression konnten bei Testung des Tumormarkers CK19 gemessen werden. Hier wurden dieselben Auffälligkeiten wie bereits bei Mig-7 deutlich: Eine Hochregulation konnte erneut bei den drei Endometriumkarzinompatientinnen im Anfangsstadium (Pat. 3, Pat. 8 und Pat. 12), sowie beim bereits deutlich fortgeschrittenen Tumor der Patientin Pat. 11 beobachtet werden. Auch hier verringerte sich der RQ nach Chemotherapie von 3,041 (Pat. 2) auf 0,769 (Pat. 4). Die Patientinnen mit Tumoren im mittleren Größenbereich, das seröse und klarzellige Adenokarzinom lagen mit ihren Werten deutlich hinter den Patientinnen Pat. 3, Pat. 8, Pat. 11 und Pat. 12 (vgl. Tab.17 und 18).

Tabelle 18 zeigt eine erneute Übersicht aller Patientendaten. Die vier Patientinnen mit den höchsten Werten der Expression sind farblich markiert, die jeweiligen Werte für Mig-7 und CK19 hinzugefügt. Zusätzlich sind die Patientinnen mit den höchsten RQ-Daten entsprechend ihres Stadiums unterschiedlich farblich hervorgehoben.

Patient	T	N	M	G	FIGO	Primärfall	Histologie	Menopause	CK19 (RQ)	Mig-7 (RQ)
Pat. 1	pT1a	Nx	M0	G1	IA	ja	endometroides Adenokarzinom	postmenopausal	0.666	1.283
Pat. 2	pT2	N0	M1	G2-3	IIB	nein	metastasiertes Endometriumkarzinom	postmenopausal	3.041	1.297
Pat. 3	pT1a	N0	M0	G1	IA	ja	endometroides Adenokarzinom	Klimakterium	44.902	73.720
Pat. 4									0.769	0.452
Pat. 5	pT1a	N0	Mx	G1	IA	nein	Endometriumkarzinom Rezidiv	postmenopausal	0.206	0.335
Pat. 6	pT1a	N0	Mx	G2	IA	ja	endmetroides Adenokarzinom	prämenopausal	0.003	0.820
Pat. 7	pT2	N2 (7/18)	M0	G3	IIIC2	ja	klarzelliges Adenokarzinom	Klimakterium	1.925	6.134
Pat. 8	pT1a	N0	M0	G1	IA	ja	endometroides Adenokarzinom	postmenopausal	168.100	404.101
Pat. 9	pT3a	N1 (1/18)	Mx	high	IIIC	ja	seröses Adenokarzinom	postmenopausal	0.040	0.026
Pat.10	pT1a	N0	Mx	G1	IA	ja	endometroides Adenokarzinom	postmenopausal	0.666	0.820
Pat.11	pT4b	pN2 (6/8)	M1	G2	IVB	ja	endometroides Adenokarzinom	Klimakterium	7.969.585	165.221
Pat.12	pT1a	pN0	Mx	G1	IA	ja	endometroides Adenokarzinom	postmenopausal	16.798.969	215.731
Pat.13	pT1a	pNx	Mx	G2	IA		endometroides Adenokarzinom	postmenopausal	15.692	1.192

Pat. 2 und Pat. 4: Patientin vor (Pat. 2) und nach Pat. 4) Chemotherapie

Patientin mit sehr großem, dedifferenziertem Tumor
 Patientin mit kleinem Tumor, im Anfangsstadium

Tabelle 18: Übersicht Patientenwerte der relativen Quantifizierung von CK19 und Mig-7

Eine Gegenüberstellung der Marker CCNE2 und MAL2 sowie von CK19 und Mig-7 an Hand ihrer RQ Ergebnisse in den Patientenproben erfolgt in Abbildung 18 bzw. 19. Werte > 1 weisen Säulen nach oben, jene < 1 Säulen nach unten auf. Konnte ein Marker nicht detektiert werden, wurde keine Säule erstellt. Hier wird erneut deutlich, dass sich für Pat. 3, Pat. 8, Pat. 11 und Pat. 12 die höchsten RQ bei CK19 und Mig-7 einstellten, während CCNE2 und MAL2 keine Hochregulation der Genexpression erreichten.

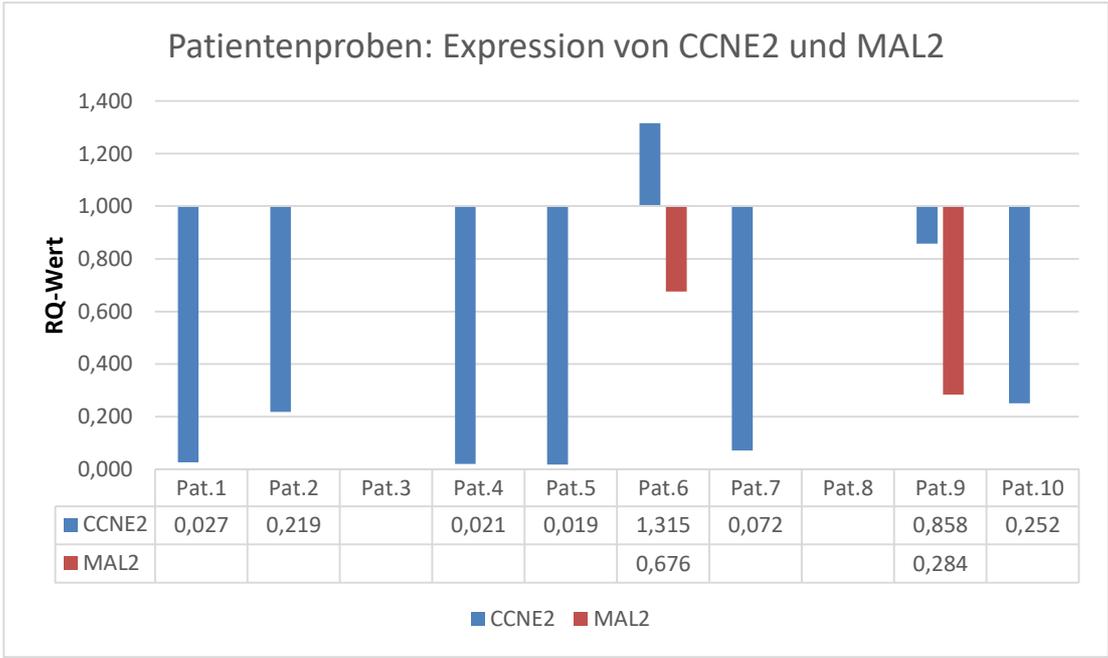


Abbildung 18: Expression von CCNE2 und MAL2 in Patientenproben

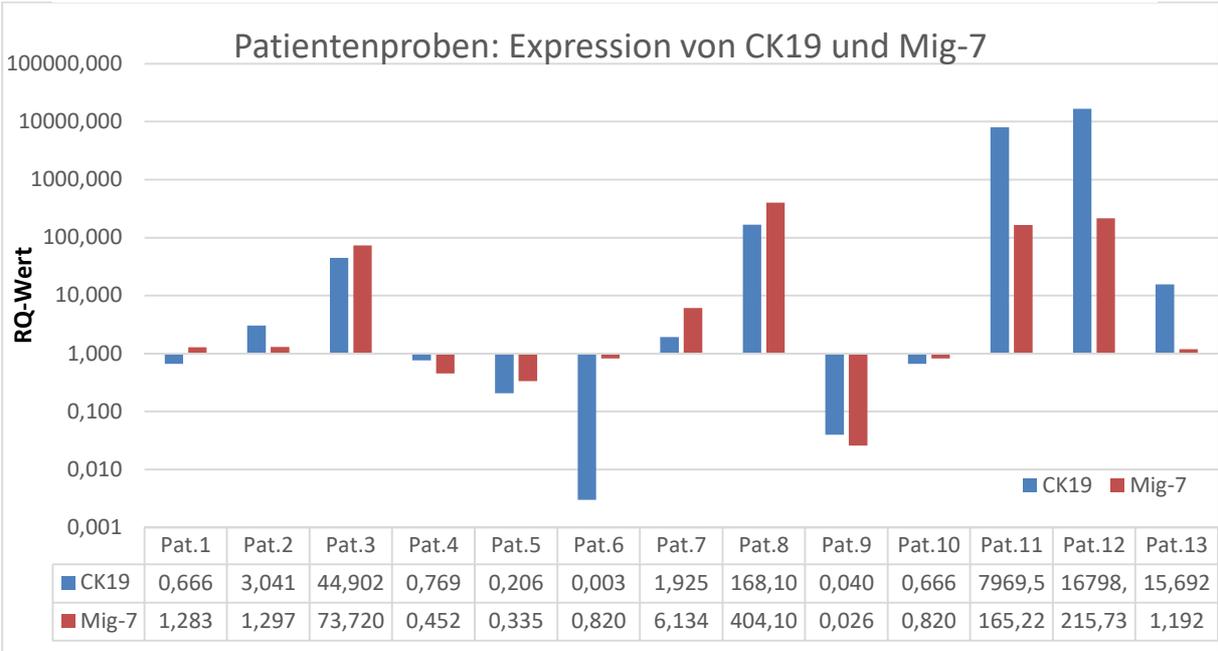


Abbildung 19: Expression von CK19 und Mig-7 in Patientenproben

Zusammenfassend fand für MAL2 bei allen Patientenproben entweder eine Herabregulierung statt oder der Marker konnte nicht detektiert werden. Bei CCNE2 wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet, nur eine Patientin zeigte ein RQ > 1 und damit eine Hochregulation (vgl. Tab.15). Obwohl CK19 und Mig-7 in den Spiking-Experimenten keinen derart homogenen Anstieg der Genexpression erzielt hatten wie MAL2, erreichten sie in der PCR-Untersuchung der Patientinnenproben deutlich höhere RQ-Werte. Führend waren hier Pat. 3, Pat. 8, Pat. 11 und Pat. 12. Pat. 11 litt unter einem großen, dedifferenzierten Tumor, während Pat. 3, Pat. 8 und Pat. 12 sich mit FIGO Stadium 1A und Grading G1 eher im Anfangsstadium der Tumorerkrankung befanden. Die Patientin, deren Blutproben zweizeitig untersucht worden waren, zeigte vor ihrer Chemotherapie (Pat. 2) eine Hochregulation von CK19 und Mig-7, nach der therapeutischen Maßnahme (Pat. 4) eine im Vergleich zur Negativprobe verminderte Expression.

3.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wurden die Patienten nach unterschiedlichen Kriterien in Subgruppen eingeteilt und deren Genexpression für CK19 und Mig-7 auf Zusammenhänge überprüft: Alter der Patientin bei Erstdiagnose, Tumorgöße, Lymphknotenbefall, Metastasierung, Grading und Stadium nach FIGO (vgl. Tab.19). Diese wurden einer Signifikanztestung mit SPSS V. 22 zugeführt.

Eigenschaft	Subgruppe 1	Subgruppe 2
Alter bei Erstdiagnose	< 60 Jahre	> 60 Jahre
Tumorgöße	pT1	pT2-4
Lymphknotenbefall	N0	N1-2
Metastasierung	M0	M1
Grading	G1	G2-3
FIGO-Stadium	I	II-IV

Tabelle 19: Einteilung der Patientinnen in Subgruppen

Sowohl bei der Untersuchung von CK19 als auch bei Mig-7 ergaben sich in allen Kategorien p-Werte über 0,05 (vgl. Tab.20). Es konnte somit kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Eigenschaft	CK19 (p-Wert)	Mig-7 (p-Wert)
Alter bei Erstdiagnose	0,7206	0,1741
Tumorgröße	0,9892	0,6601
Lymphknotenbefall	0,9913	0,9384
Metastasierung	0,3974	0,8656
Grading	0,5672	0,3524
FIGO-Stadium	0,9581	0,6732

Tabelle 20: Statistischer Vergleich der Genexpression in verschiedenen Subgruppen

4 Diskussion

Bei zahlreichen Patientinnen mit Endometriumkarzinom erscheinen CTCs im Blut [122]. Deren Auftreten wurde mit Hilfe der Immunzytochemie und Immunfloreszenz mit invasivem Tumorwachstum und Lymphknotenbefall in Zusammenhang gebracht [123]. Folglich könnte sich der Nachweis von CTCs als Verfahren der Diagnostik und Instrument der individuellen Nachsorge etablieren. Bisher existieren keine standardisierten Nachweismethoden [124, 125] und die PCR von Blutproben mit Testung auf verschiedene Markergene könnte als nicht-invasive Methode zum Einsatz kommen.

4.1 Vorversuche: Spiking-Experimente

Das Versehen von Blutproben gesunder Spenderinnen mit einer zunehmenden Anzahl an Tumorzellen (Spiking), das in der vorliegenden Arbeit Anwendung fand, stellt ein geeignetes Modellsystem dar, da wertvolle Patientinnenproben erst in weiterführenden Experimenten verwendet werden. Das EDTA-Blut wurde stets sofort nach Abnahme weiterverarbeitet, um die mononukleäre Zellfraktion optimal anreichern und daraus die RNA isolieren zu können. Auch wurden in der Weiterverarbeitung nach Möglichkeit RNA-Proben mit einer Ratio zwischen 1,7 bis 1,9 zu cDNA umgeschrieben, um die geforderte Reinheit zu gewährleisten.

CK20 hatte in früheren Studien gute Ergebnisse geliefert und wurde als aussagekräftiges Markergen beschrieben [93, 94]. In den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit wurde es nur geringfügig oder teilweise gar nicht detektiert. Die Ursache hierfür könnte eine mangelhafte Leistung des verwendeten Primers sein. In einer weiteren Versuchsreihe sollte CK20 somit mit einem weiteren Primer untersucht werden, um den hier verwendeten auf seine Fähigkeit zur CTC-Detektion zu überprüfen.

Für CCNE2 konnte eine Kurve der Relativen Quantifizierung RQ erstellt werden. Hier zeigte sich bei Zugabe von 10 und 100 Zellen/ml zunächst ein flacher Kurvenverlauf, von 100 auf 1000 Zellen/ml kam es zu einem deutlich steileren Anstieg. Dies kann damit in Zusammenhang stehen, dass CCNE2 mit steigender Tumorzellzahl vermehrt nachweisbar wird.

Der Marker Mig-7 lieferte die RQ-Werte für die Erstellung einer Kurve. Während diese bei Spiking mit 10 Zellen/ml nur flach anstieg, zeigte sich bei Erhöhung der Zellmenge ein steilerer Verlauf. Auch dies kann mit einer besseren Detektion bei vermehrter Tumorzellzahl erklärt werden.

CK19 zeigte sowohl bei der Zelllinie HEC-1A als auch bei RL95-2 eine steigende Expression mit zunehmender Zellzahl. Auch MAL2, das sich als bester Marker in den Vorversuchen erwies, konnte in beiden Zelllinien ansteigend detektiert werden.

Aufgrund ihrer Leistung in den Vorversuchen wurden CCNE2, MAL2, CK19 und Mig-7 auf die Untersuchung der Patientenproben übertragen.

4.2 Untersuchung der Patientenproben

Die vier Marker, die in den Spiking-Experimenten die besten Ergebnisse geliefert hatten, wurden im Anschluss auf die Patientenproben übertragen. Hierbei wurden 13 Blutproben von 12 Patientinnen mit Endometriumkarzinom untersucht, davon eine Patientin zweizeitig (eine Probe wurde vor, eine weitere nach Abschluss ihrer Chemotherapie abgenommen).

CCNE2 und MAL2 konnten in den meisten Patientinnenproben nicht detektiert werden oder zeigten RQ-Werte < 1 was für eine Herabregulierung steht. CCNE2 war bereits beim Spiking erst bei höheren Zellzahlen/ml angestiegen. Obwohl MAL2 in den Vorversuchen die beste Leistung gezeigt hatte, konnte dies nicht auf die Patientinnen mit Endometriumkarzinom übertragen werden. Dies spricht gegen eine Eignung als Biomarker für die Diagnostik. Da das Potenzial von MAL2 in den Vorversuchen am deutlichsten ausgeprägt war, sollte seine Leistung jedoch erneut an einem größeren Patientenkollektiv getestet werden.

CK19 und Mig-7 erreichten deutlich höhere RQ-Werte. Führend waren hier vor allem eine Patientin im FIGO-Stadium 4B (Pat. 11) und drei Patientinnen mit Tumor Stadium FIGO1A (Pat. 3, Pat. 8 und Pat. 12).

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse aus den RT-PCR-Versuchen der Patientenproben stellt sich in erster Linie folgende Frage: Wie kann es sein, dass sich hohe Werte der Genexpression für CK19 und Mig-7 sowohl bei einer Patientin mit großem, dedifferenzierten Tumor als auch bei Patientinnen im Anfangsstadium finden lassen, während die Tumore mit mittlerer Größe und mäßiger Differenzierung nur eine geringe Menge dieser Marker aufweisen? Einen möglichen Erklärungsansatz für den Verlauf bei CK19 beschreibt das Modell der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT). In Studien wurde gezeigt, dass eine verminderte Expression von CK8, CK18 und CK19 mit Anwesenheit von Mikrometastasen beim Mammakarzinom assoziiert war, während höhere Werte mit einem besseren Outcome in Verbindung gebracht werden konnten [126-128].

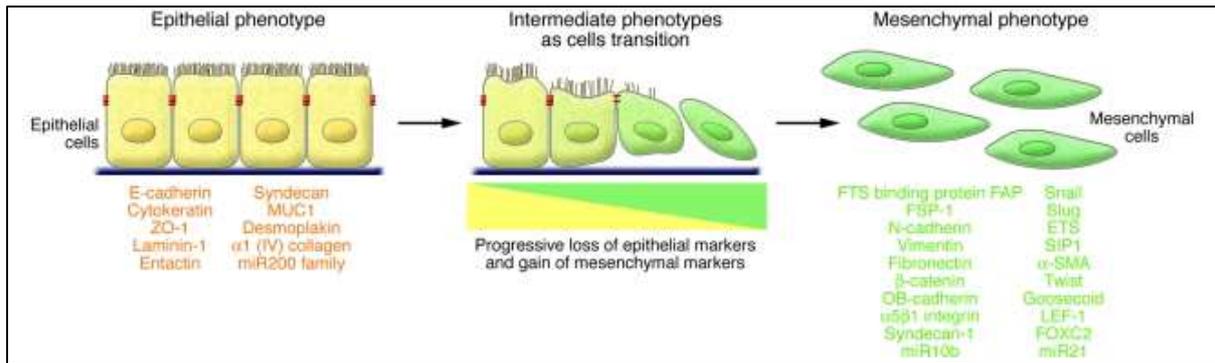


Abbildung 20: Ablauf der EMT Quelle: [129]

Beim Endometriumkarzinom handelt es sich um einen vom Epithel ausgehenden (epithelialen) Tumor, bei CK19 um einen epithelialen Marker. Im Zuge der Metastasierung erlaubt es die EMT polarisierten Epithelzellen, welche normalerweise mit der Basalmembran in Kontakt stehen, sich mehrerer biochemischer Veränderungen zu unterziehen. Diese ermöglichen es der Zelle, sich durch einen mesenchymalen Phänotyp von der Epithelschicht zu entfernen, Tight Junctions und Adhäsionsmoleküle aufzugeben und zusätzlich eine vermehrte Resistenz gegenüber Apoptose zu erlangen. Der Begriff Transformation wurde durch Transition ersetzt, da es sich um einen reversiblen Prozess handelt, der als mesenchymal-epitheliale Transition auch umgekehrt stattfinden kann (MET).

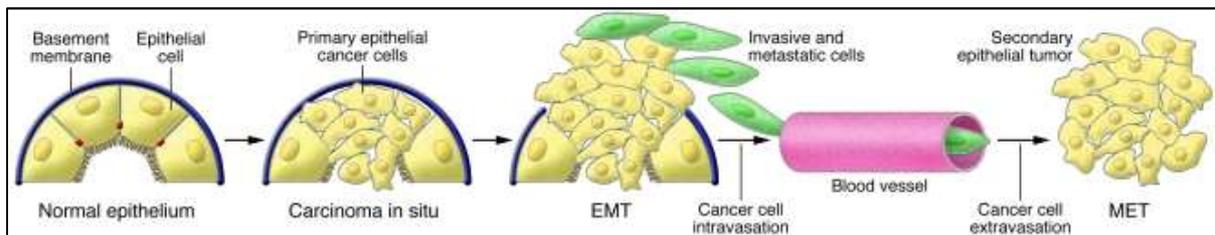


Abbildung 21: Beitrag der EMT zur Krebsprogression Quelle: [129]

Denn die sich von den EMT Zellen ableitenden Zellen in Zweitkolonien etablieren oft erneut die epithelialen Eigenschaften des Primärtumors und verlieren ihren erworbenen mesenchymalen Charakter um sich am Zielort besser einnisten zu können [129]. Tumorzellen mit dieser hohen Plastizität, also der Fähigkeit sowohl EMT als auch MET zu durchlaufen, scheinen aggressiver zu sein als vollständig differenzierte Zellen, weswegen es sinnvoll wäre, diese spezifisch nachweisen zu können [130]. Die hohen Werte für CK19 im Anfangsstadium und bei fortgeschrittenem Tumor würden sich folglich durch unterschiedliche Stadien der metastasierenden Zellen erklären lassen. Zu Beginn lässt sich durch die noch nicht vollzogene EMT eine hohe Expression des epithelialen Markers CK19 messen, diese sinkt im Verlauf bei fortschreitender Erkrankung (Patientinnen in intermediären Stadien) durch den Erwerb mesenchymaler Zelleigenschaften ab. Bei bereits stark metastasiertem Tumorstadium erfolgt nun umgekehrt eine Umwandlung von mesenchymal zu epithelial (MET), die RQ-Werte steigen erneut an.

Zwischen den Tumoreigenschaften und den Werten der relativen Quantifizierung konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Dies liegt am ehesten darin begründet, dass im Rahmen dieser Grundlagenforschung lediglich 13 Patientenproben untersucht wurden. Es ist durchaus sinnvoll, die Versuche auf ein größeres Patientenkollektiv auszuweiten, um Aussagen über Zusammenhänge treffen zu können.

4.3 Ausblick

Da sich bei der Beschränkung auf einzelne Tumormarker oft Schwankungen der Genexpression ergeben, sollten stets mehrere Gene betrachtet werden. Dies ermöglicht, dass vorhandene CTCs nicht nur festgestellt, sondern auch genauer charakterisiert werden können. Auch der Einfluss der EMT könnte so berücksichtigt werden. Der Vorteil in der Vorversuchsreihe ist, dass es sich hierbei um ein Modellsystem handelt, in dem in Betracht kommende Marker ohne Verschwendung wertvoller Ressourcen getestet werden können. Nur die sich darin etablierten Markergene werden auf ihre Expression in Patientenproben untersucht. Dies erleichtert eine Ausdehnung auf weitere Marker. Weitere zu untersuchende Gene könnten beispielsweise NUCKS und Era sein. Bei Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate (NUCKS) handelt es sich um einen Biomarker, dessen Überexpression beim Endometriumkarzinom mit einer negativen Prognose assoziiert worden ist. Erhöhtes NUCKS ging einher mit fortgeschrittenen FIGO Stadien, Gefäß- und Lymphknotenbefall sowie Rezidiv [131]. Auch die Abwesenheit von Östrogenrezeptor- α (Era) wurde bereits mit höherem Grading und fortgeschrittener Erkrankungsintensität in Verbindung gebracht [132].

Die CTC-Detektion ist noch nicht Teil der klinischen Routinediagnostik beim Endometriumkarzinom, wohl aber bereits in der Erprobung beim Mamma- oder Prostatakarzinom [133, 134]. Einer der Gründe hierfür ist die bisher nicht vorhandene Standardisierung und Automatisierung der einzelnen Arbeitsschritte. Aufwendige experimentelle Verfahren führen zu entsprechenden Unterschieden der Ergebnisse innerhalb eines Labors und vor allem zwischen verschiedenen Laboren. Obwohl es sich bei der CTC-Diagnostik um eine im Vergleich zur Knochenmarkpunktion weniger invasive Methode handelt, ist ihr klinischer Nutzen bisher deutlich weniger geklärt. Eine Kombination der qRT-PCR mit bereits etablierten Systemen zur CTC-Detektion wäre denkbar. Hier könnte beispielsweise das Cell Search® System der Firma Veridex zum Einsatz kommen.

Folglich sollten für eine reliable Detektion nicht nur mehrere Systeme evaluiert, möglicherweise zukünftig auch kombiniert werden, sondern auch ein Satz von mehreren Genen untersucht werden. Mit Hilfe dieser Strategie könnte durch eine genaue Detektion und auch Charakterisierung der CTCs ein wichtiger Beitrag zur Behandlung des Endometriumkarzinoms

geleistet werden. Eine weitere Säule für therapieweisendes Staging bei Erstdiagnöse wäre damit geschaffen, um möglicherweise eine Übertherapie wie eine pelvine Lymphknotenexstirpation oder zytostatische Systemtherapie zu vermeiden. Darüber hinaus könnten Therapiestrategien im Rahmen der Nachsorge evaluiert und angepasst werden, was die Prognose der betroffenen Patienten positiv beeinflussen könnte.

5 Zusammenfassung

Mit jährlich 142 000 Neuerkrankungen und 42 000 assoziierten Todesfällen ist das Endometriumkarzinom die häufigste Krebserkrankung des weiblichen Genitaltrakts weltweit. Fernmetastasen beeinflussen erheblich die Prognose der Tumorpatientinnen und stellen eine wichtige Ursache krebsassoziierter Todesfälle dar. In der Kaskade der Metastasierung über Blut- und Lymphwege wird zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Durch die Tatsache, dass sich CTCs in bestimmten Eigenschaften und damit in ihrer Genexpression von Blutzellen unterscheiden, wird ihr Nachweis im Blut per Real-Time PCR ermöglicht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich die Markergene CK19, CK20, CCNE2, MAL2 und Mig-7 zur CTC-Detektion mittels RT-PCR eignen.

Das experimentelle Vorgehen beinhaltete eine Vorversuchsreihe, bestehend aus Spiking-Experimenten, und die anschließende Untersuchung von Blutproben von Endometriumkarzinompatientinnen. In den Vorversuchen wurden Blutproben gesunder Spenderinnen mit jeweils 0, 10, 100 und 1000 Endometriumkarzinomzellen pro ml versehen (sog. Spiking). Als Zelllinien wurden HEC-1A und RL95-2 kultiviert. Nach Isolierung der Leukozyten, Extraktion der RNA und Umschreibung in cDNA wurde eine Real-Time-PCR auf die Markergene CK19, CK20, CCNE2, MAL2 und Mig-7 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Aus den gemessenen Werten RQ, die für die Höhe der jeweiligen Genexpression stehen, konnten für die einzelnen Marker Graphen erstellt werden. Im Anschluss erfolgte die Übertragung der Ergebnisse aus den Vorversuchen und der darin geeigneten Marker auf Patientenproben. Mit dem EDTA-Vollblut von 12 Patientinnen mit Endometriumkarzinom, davon eine Patientin vor und nach Chemotherapie (insgesamt 13 Blutproben) und einer gesunden Kontrolle wurde nach demselben Protokoll wie bereits in den Spiking-Experimenten verfahren, jedoch ohne Zusatz von Zellen aus Tumorzelllinien. Es wurden die Marker CK19, CCNE2, MAL2 und Mig-7 untersucht. Eine statistische Auswertung erfolgte mit SPSS V.22. CK20 konnte in allen PCR-Durchgängen sehr spät bzw. nicht detektiert werden, es erfolgte somit keine Übertragung dieses Markergens auf die Patientenproben. Bei den Markern CK19, MAL2, CCNE2 und Mig-7 konnte in der Real-Time-PCR eine ansteigende Genexpression mit zunehmender Zellzahl beobachtet werden. Bei der anschließenden Übertragung auf Patientenproben erwies sich MAL2 als ungeeignet, auch CCNE2 erzielte nur niedrige Expressionswerte. Sowohl bei einer Patientin mit metastasiertem Endometriumkarzinom als auch bei drei Patientinnen in Frühstadien wurde erhöhte Genexpression von CK19 und Mig-7 festgestellt. Die Patientin mit Chemotherapie zeigte vor ihrer Behandlung eine deutlich höhere Expression von CK19 und Mig-7 als bei Blutabnahme im Anschluss daran. Zur statistischen Analyse erfolgte die Einteilung der Patientinnen in Subgruppen. Sowohl für CK19 als

auch für Mig-7 konnten mit p-Werten stets über 0,05 keine statistisch signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden.

CK19 erwies sich als der beste Marker um CTCs im Blut von Patientinnen mit Endometriumkarzinom zu detektieren, auch Mig-7 ist geeignet. Ihr Nachweis könnte eine entscheidende Rolle in der Stadieneinteilung, Prognose und somit auch Therapieauswahl mit sich ziehen und sollte deswegen auf ein größeres Patientenkollektiv ausgedehnt werden. Als nicht-invasive Methode stellt die PCR ein mögliches Instrument zur CTC-Diagnostik und damit individualisierten Therapie dar. Bei den Spiking-Experimenten handelt es sich um ein geeignetes Modellsystem, um in Frage kommende PCR-Markergene zu testen, da wertvolle Ressourcen (Patientenproben) erst nach einer Auslese der jeweiligen geeigneten Biomarker verwendet werden. CK20 sollte mit einem weiteren Primer untersucht, CCNE2 und MAL2 sollten zur weiteren Überprüfung auf eine größere Patientenzahl übertragen werden. Eine Erklärung für die hohen RQ-Werte als Maß der Genexpression für CK19 und Mig-7 sowohl bei Patientinnen mit Tumoren im Anfangsstadium als auch bei fortgeschrittenem Endometriumkarzinom mit Lymphknotenbefall liefert das Modell der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT). Es beschreibt eine Plastizität und damit Veränderung der Tumorzellen im Laufe der Metastasierung. Dies betont eine Eignung von CK19 zur genaueren Klassifizierung des jeweiligen Stadiums einer bestehenden Tumorerkrankung (beispielweise in Früh-, Intermediärstadium und fortgeschrittenes Stadium). Um auch statistisch genauer auf signifikante Zusammenhänge zu prüfen, sollte die Testung auf CK19 und Mig-7 in einem nächsten Schritt auf ein größeres Patientenkollektiv übertragen werden, da hier lediglich 13 Proben untersucht wurden. Auch eine Kombination mit zusätzlichen Markergenen (z.B. NUCKS und Er α) und ein Miteinbeziehen weiterer bereits etablierter Methoden der CTC-Diagnostik wie das Veridex Cell Search® System sind sinnvoll, um neben einer Detektion eine Charakterisierung der Tumorzellen zu ermöglichen. Dies könnte neben einer detaillierteren Diagnostik und Nachsorge eine individualisierte Therapie der Patientinnen mit Endometriumkarzinom und ein besseres Outcome ermöglichen.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis:

1. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom, Konsultationsfassung Langversion 0.1, AWMF Registernummer: 032/034-OL, 2017.
2. Amant, F., et al., *Endometrial cancer*. Lancet, 2005. **366**(9484): p. 491-505.
3. Dinkelspiel, H.E., et al., *Contemporary clinical management of endometrial cancer*. Obstet Gynecol Int, 2013.
4. Beral, V., D. Bull, and G. Reeves, *Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet, 2005. **365**(9470): p. 1543-1551.
5. Fisher, B., et al., *Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(7): p. 527-537.
6. Emons, G. and W. Heyl, *Hormonal treatment of endometrial cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2000. **126**(11): p. 619-623.
7. Wright, J.D., et al., *Contemporary management of endometrial cancer*. Lancet, 2012. **379**(9823): p. 1352-1360.
8. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet, 2008. **371**(9612): p. 569-578.
9. Schapira, D.V., et al., *Upper-body fat distribution and endometrial cancer risk*. Jama, 1991. **266**(13): p. 1808-1811.
10. Rose, P.G., *Endometrial carcinoma*. N Engl J Med, 1996. **335**(9): p. 640-649.
11. Dossus, L., et al., *Reproductive risk factors and endometrial cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Int J Cancer, 2010. **127**(2): p. 442-451.
12. Schmandt, R.E., et al., *Understanding obesity and endometrial cancer risk: opportunities for prevention*. Am J Obstet Gynecol, 2011. **205**(6): p. 518-525.
13. Watson, P., et al., *The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Am J Med, 1994. **96**(6): p. 516-520.
14. Hecht, J.L. and G.L. Mutter, *Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis*. J Clin Oncol, 2006. **24**(29): p. 4783-4791.
15. Moodley, M. and C. Roberts, *Clinical pathway for the evaluation of postmenopausal bleeding with an emphasis on endometrial cancer detection*. J Obstet Gynaecol, 2004. **24**(7): p. 736-741.
16. Gredmark, T., et al., *Histopathological findings in women with postmenopausal bleeding*. Br J Obstet Gynaecol, 1995. **102**(2): p. 133-136.
17. Society, A.C., *Cancer Facts & Figures*, American Cancer Society. 2014(New York).
18. Marsden, D.E. and N.F. Hacker, *Optimal management of endometrial hyperplasia*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2001. **15**(3): p. 393-405.
19. ACOG, *ACOG practice bulletin, clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists, number 65, August 2005: management of endometrial cancer*. Obstet Gynecol, 2005. **106**(2): p. 413-425.
20. Gupta, J.K., et al., *Ultrasonographic endometrial thickness for diagnosing endometrial pathology in women with postmenopausal bleeding: a meta-analysis*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2002. **81**(9): p. 799-816.
21. Robertson, G., *Screening for endometrial cancer*. Med J Aust, 2003. **178**(12): p. 657-659.
22. Institute, N.C. *Staging*. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Detection/staging>
23. Krebsinformationsdienst, D.K. *Arztbriefe, Krankenakte: Befunde und Abkürzungen verstehen*. Available from: <http://www.krebsinformationsdienst.de/untersuchung/tnm.php>

24. Horn, L.C., et al., [*Current TNM/FIGO classification for cervical and endometrial cancer as well as malignant mixed mullerian tumors. Facts and background*]. *Pathologe*, 2011. **32**(3): p. 239-243.
25. Petru, E., et al., *Gynecologic Cancer Intergroup (GCIg) proposals for changes of the current FIGO staging system*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2009. **143**(2): p. 69-74.
26. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V., K.U., *Empfehlungen für die Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms*. 2011.
27. Krebsinformationsdienst, D.K. *Mikroskopische Diagnostik in der Krebsmedizin: Der Blick auf Gewebe und Zellen*. Available from: <https://www.krebsinformationsdienst.de/untersuchung/mikroskopische-diagnostik.php#>.
28. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 1983. **15**(1): p. 10-17.
29. Clement, P.B. and R.H. Young, *Non-endometrioid carcinomas of the uterine corpus: a review of their pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects*. *Adv Anat Pathol*, 2004. **11**(3): p. 117-142.
30. Ayeni, T.A., et al., *Comparative outcomes assessment of uterine grade 3 endometrioid, serous, and clear cell carcinomas*. *Gynecol Oncol*, 2013. **129**(3): p. 478-485.
31. Denschlag, D., U. Ulrich, and G. Emons, *Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms*. *Dtsch Arztebl International*, 2011. **108**(34-35): p. 571-577.
32. Schubert-Fritschle, G., et al., *Zur Epidemiologie der Malignome des Corpus uteri*. *Malignome des Corpus uteri (Manual des Tumorzentrum München)*, 3rd edn. Zuckschwerdt, Munich, 2007: p. 1-7.
33. Maneschi, M., et al., *Surgical pathological staging of endometrial carcinoma and results of treatment*. *Eur J Gynaecol Oncol*, 1992. **13**(1 Suppl): p. 30-35.
34. Prat, J., *Prognostic parameters of endometrial carcinoma*. *Hum Pathol*, 2004. **35**(6): p. 649-662.
35. Gal, D., et al., *Lymphovascular space involvement--a prognostic indicator in endometrial adenocarcinoma*. *Gynecol Oncol*, 1991. **42**(2): p. 142-145.
36. Creasman, W.T., et al., *Prognosis of papillary serous, clear cell, and grade 3 stage I carcinoma of the endometrium*. *Gynecol Oncol*, 2004. **95**(3): p. 593-596.
37. Hamilton, C.A., et al., *Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(5): p. 642-646.
38. Zaino, R.J., et al., *The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study*. *Cancer*, 1991. **68**(10): p. 2293-2302.
39. Amant, F., et al., *Treatment modalities in endometrial cancer*. *Curr Opin Oncol*, 2007. **19**(5): p. 479-485.
40. Beckmann, K., et al., *Effects of variations in hysterectomy status on population coverage by cervical screening*. *Aust N Z J Public Health*, 2003. **27**(5): p. 507-512.
41. Ashworth, T., *A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death*. *Aust Med J*, 1869. **14**(3): p. 146-149.
42. Franken, B., et al., *Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(5).
43. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(6): p. 448-456.
44. Bragado, P., et al., *Microenvironments dictating tumor cell dormancy*. *Recent Results Cancer Res*, 2012. **195**: p. 25-39.
45. Diel, I.J., et al., *Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(6): p. 357-363.
46. Pantel, K. and U. Woelfle, *Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors*. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2004. **18**(2): p. 120-125.

47. Riethdorf, S. and K. Pantel, *Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization*. Pathobiology, 2008. **75**(2): p. 140-148.
48. Ring, A., I.E. Smith, and M. Dowsett, *Circulating tumour cells in breast cancer*. Lancet Oncol, 2004. **5**(2): p. 79-88.
49. Smerage, J.B. and D.F. Hayes, *The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer*. Br J Cancer, 2006. **94**(1): p. 8-12.
50. Gupta, G.P. and J. Massagué, *Cancer metastasis: building a framework*. Cell, 2006. **127**(4): p. 679-695.
51. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(8): p. 781-791.
52. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(7): p. 1420-1430.
53. Fehm, T., et al., *Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers*. Gynecologic oncology, 2006. **103**(3): p. 942-947.
54. Ji, X.Q., et al., *Real-time quantitative RT-PCR detection of disseminated endometrial tumor cells in peripheral blood and lymph nodes using the LightCycler System*. Gynecol Oncol, 2006. **100**(2): p. 355-360.
55. Graves, H. and B.J. Czerniecki, *Circulating tumor cells in breast cancer patients: an evolving role in patient prognosis and disease progression*. Patholog Res Int, 2011. **2011**.
56. Andreopoulou, E., et al., *Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system*. Int J Cancer, 2012. **130**(7): p. 1590-1597.
57. Pathologie-Online. *Immunhistologie*. Available from: <http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie/>.
58. Kagan, M., et al., *Circulating tumor cells as cancer markers, a sample preparation and analysis system*. Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, And Clinical Applications, 2002: p. 495-498.
59. Paterlini-Brechot, P. and N.L. Benali, *Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions*. Cancer Lett, 2007. **253**(2): p. 180-204.
60. Ghossein, R.A., S. Bhattacharya, and J. Rosai, *Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(8): p. 1950-1960.
61. Wikipedia. *Grafik der Polymerase-Kettenreaktion*. 2013; Available from: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=24766511>.
62. Newton, C.R., A. Graham, and J.S. Ellison, *PcR*. 1997: BIOS Scientific Publishers.
63. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-491.
64. Holzapfel, B. and L. Wickert, *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete*. Biologie in unserer Zeit, 2007. **37**(2): p. 120-126.
65. Holland, P.M., et al., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7276-7280.
66. Livak, K.J., et al., *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. PCR Methods Appl, 1995. **4**(6): p. 357-362.
67. BIO-RAD. *Hydrolysis probes are hydrolyzed by Taq polymerase*. 2016; Available from: http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/solutions/technologies/gene_expression/qPCR_real-time_PCR/technology_detail/real-time-pcr-detection-standard-pcr-primer-and-hydrolysis-probe.gif.
68. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7).

69. Tristan, C., et al., *The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments*. Cell Signal, 2011. **23**(2): p. 317-323.
70. Meyer, A., et al., *Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity*. BMC Evol Biol, 2010. **10**: p. 70.
71. Bas, A., et al., *Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes*. Scand J Immunol, 2004. **59**(6): p. 566-573.
72. Goidin, D., et al., *Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations*. Anal Biochem, 2001. **295**(1): p. 17-21.
73. Suzuki, T., P.J. Higgins, and D.R. Crawford, *Control selection for RNA quantitation*. Biotechniques, 2000. **29**(2): p. 332-337.
74. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
75. Burchill, S.A., et al., *Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Br J Cancer, 1995. **71**(2): p. 278-281.
76. Moll, R., D.L. Schiller, and W.W. Franke, *Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns*. J Cell Biol, 1990. **111**(2): p. 567-580.
77. Zemer, R., et al., *Expression of cytokeratin-20 in endometrial carcinoma*. Gynecologic oncology, 1998. **70**(3): p. 410-413.
78. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. Cell, 1982. **31**(1): p. 11-24.
79. Pujol, J.-L., et al., *Serum fragment of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA 21-1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer*. Cancer research, 1993. **53**(1): p. 61-66.
80. Ding, S.-J., et al., *From proteomic analysis to clinical significance overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis*. Molecular & Cellular Proteomics, 2004. **3**(1): p. 73-81.
81. Gadducci, A., et al., *The clinical relevance of serum CYFRA 21-1 assay in patients with ovarian cancer*. International Journal of Gynecological Cancer, 2001. **11**(4): p. 277-282.
82. Wong, I.H., et al., *Quantitative relationship of the circulating tumor burden assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients with Dukes' stage, serum carcinoembryonic antigen level and tumor progression*. Cancer letters, 2001. **162**(1): p. 65-73.
83. Wang, H., et al., *Micrometastases detected by cytokeratin 19 expression in sentinel lymph nodes of patients with early-stage cervical cancer*. International Journal of Gynecological Cancer, 2006. **16**(2): p. 643-648.
84. Noack, F., et al., *A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications*. Int J Biol Markers, 2000. **15**(1): p. 100-104.
85. Kurec, A.S., et al., *Use of the APAAP method in the classification and diagnosis of hematologic disorders*. Clin Lab Med, 1988. **8**(1): p. 223-236.
86. Schoenfeld, A., et al., *The detection of micrometastases in the 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, 1997. **33**(6): p. 854-861.
87. Stathopoulou, A., et al., *Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance*. J Clin Oncol, 2002. **20**(16): p. 3404-3412.

88. Mitas, M., et al., *Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel*. International journal of cancer, 2001. **93**(2): p. 162-171.
89. Andergassen, U., et al., *Detection of Tumor Cell-Specific mRNA in the Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer*; *Evaluation of Several Markers with Real-Time Reverse Transcription-PCR*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(1): p. 1093-1104.
90. Zebisch, M., et al., *Quantification of breast cancer cells in peripheral blood samples by real-time rt-PCR*. Anticancer Res, 2012. **32**(12): p. 5387-5391.
91. Stewart, C.J., et al., *Cytokeratin 19 expression in normal endometrium and in low-grade endometrioid adenocarcinoma of the endometrium*. Int J Gynecol Pathol, 2011. **30**(5): p. 484-491.
92. Moll, R., et al., *The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas*. Differentiation, 1993. **53**(2): p. 75-93.
93. Moll, R., et al., *Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies*. Am J Pathol, 1992. **140**(2): p. 427-447.
94. Klein, A., et al., *Detection of tumor circulating cells by cytokeratin 20 in the blood of patients with endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 2000. **78**(3 Pt 1): p. 352-355.
95. Lauper, N., et al., *Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle*. Oncogene, 1998. **17**(20): p. 2637-2643.
96. Bell, S.P. and A. Dutta, *DNA replication in eukaryotic cells*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 333-374.
97. Gudas, J.M., et al., *Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 612-622.
98. Caldon, C.E., et al., *Cyclin E2 induces genomic instability by mechanisms distinct from cyclin E1*. Cell Cycle, 2013. **12**(4): p. 606-617.
99. Butt, A.J., et al., *Cell cycle machinery: links with genesis and treatment of breast cancer*. Adv Exp Med Biol, 2008. **630**: p. 189-205.
100. Obermayr, E., et al., *Assessment of a six gene panel for the molecular detection of circulating tumor cells in the blood of female cancer patients*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 666.
101. Cassia, R., et al., *Cyclin E gene (CCNE) amplification and hCDC4 mutations in endometrial carcinoma*. J Pathol, 2003. **201**(4): p. 589-595.
102. Marazuela, M. and M.A. Alonso, *Expression of MAL and MAL2, two elements of the protein machinery for raft-mediated transport, in normal and neoplastic human tissue*. Histol Histopathol, 2004. **19**(3): p. 925-933.
103. de Marco, M.C., et al., *MAL2, a novel raft protein of the MAL family, is an essential component of the machinery for transcytosis in hepatoma HepG2 cells*. J Cell Biol, 2002. **159**(1): p. 37-44.
104. Marazuela, M., et al., *Expression and distribution of MAL2, an essential element of the machinery for basolateral-to-apical transcytosis, in human thyroid epithelial cells*. Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 1011-1016.
105. Marazuela, M., et al., *Expression of MAL2, an integral protein component of the machinery for basolateral-to-apical transcytosis, in human epithelia*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(2): p. 243-252.
106. Forozan, F., et al., *Genome screening by comparative genomic hybridization*. Trends Genet, 1997. **13**(10): p. 405-409.
107. Phillips, T.M. and J.S. Lindsey, *Carcinoma cell-specific Mig-7: a new potential marker for circulating and migrating cancer cells*. Oncol Rep, 2005. **13**(1): p. 37-44.
108. Petty, A.P., et al., *Targeting Mig-7 inhibits carcinoma cell invasion, early primary tumor growth, and stimulates monocyte oncolytic activity*. Molecular cancer therapeutics, 2009. **8**(8): p. 2412-2423.
109. Crouch, S., C.S. Spidel, and J.S. Lindsey, *HGF and ligation of alphavbeta5 integrin induce a novel, cancer cell-specific gene expression required for cell scattering*. Exp Cell Res, 2004. **292**(2): p. 274-287.

110. Petty, A.P., et al., *Overexpression of carcinoma and embryonic cytotrophoblast cell-specific Mig-7 induces invasion and vessel-like structure formation*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1763-1780.
111. Pfaffl, M.W., *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpektrum, 2004. **1**(10): p. 92-95.
112. Kuramoto, H., S. Tamura, and Y. Notake, *Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro*. Am J Obstet Gynecol, 1972. **114**(8): p. 1012-1019.
113. Kuramoto, H., *Studies of the growth and cytogenetic properties of human endometrial adenocarcinoma in culture and its development into an established line*. Acta Obstet Gynaecol Jpn, 1972. **19**(1): p. 47-58.
114. Presta, M., et al., *Modulation of plasminogen activator activity in human endometrial adenocarcinoma cells by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta*. Cancer Res, 1988. **48**(22): p. 6384-6389.
115. Hendricks, D.T., et al., *FHIT gene expression in human ovarian, endometrial, and cervical cancer cell lines*. Cancer Res, 1997. **57**(11): p. 2112-2115.
116. ATCC. HEC-1A. Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-112.aspx?slp=1#history>.
117. Way, D.L., et al., *Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture*. In Vitro, 1983. **19**(3 Pt 1): p. 147-158.
118. ATCC. RL95-2. Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1671.aspx#characteristics>.
119. Uphoff, C.C. and H.G. Drexler, *Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002. **38**(2): p. 79-85.
120. Genteknik, M.d.B.L.-A., *Nachweis von Mykoplasmen in Zellkulturen mittels PCR* 2011.
121. Uphoff, C.C. and H.G. Drexler, *Detection of mycoplasma contaminations*. Methods Mol Biol, 2013. **946**: p. 1-13.
122. Alonso-Alconada, L., et al., *Molecular profiling of circulating tumor cells links plasticity to the metastatic process in endometrial cancer*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 223.
123. Bogani, G., et al., *Detection of circulating tumor cells in high-risk endometrial cancer*. Anticancer Res, 2015. **35**(2): p. 683-687.
124. Koskas, M., et al., *Evaluation of models to predict lymph node metastasis in endometrial cancer: A multicentre study*. Eur J Cancer, 2016. **61**: p. 52-60.
125. Koskas, M., C. Huchon, and F. Amant, *Characteristics and prognosis of patients with early-stage endometrial cancer who refuse adjuvant radiotherapy*. Gynecol Oncol, 2016. **141**(3): p. 428-433.
126. Willipinski-Stapelfeldt, B., et al., *Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(22): p. 8006-8014.
127. Joosse, S.A., et al., *Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(4): p. 993-1003.
128. Joosse, S.A. and K. Pantel, *Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells*. Cancer research, 2013. **73**(1): p. 8-11.
129. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-1428.
130. Chao, Y.L., C.R. Shepard, and A. Wells, *Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 179.
131. Liu, T., et al., *Increased NUCKS expression is a risk factor for poor prognosis and recurrence in endometrial cancer*. American journal of cancer research, 2015. **5**(12): p. 3659.
132. Backes, F.J., et al., *Estrogen receptor-alpha as a predictive biomarker in endometrioid endometrial cancer*. Gynecologic oncology, 2016. **141**(2): p. 312-317.

133. Thalgott, M., et al., *Detection of Circulating Tumor Cells in Locally Advanced High-risk Prostate Cancer During Neoadjuvant Chemotherapy and Radical Prostatectomy*. *Anticancer Res*, 2015. **35**(10): p. 5679-5685.
134. Rack, B., et al., *Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients*. *J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(5).

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion <i>Quelle: [61]</i>	10
Abbildung 2: Funktionsweise der TaqMan™-Sonde <i>Quelle: [67]</i>	11
Abbildung 3: MAL2 in der Zelle <i>Quelle: [102]</i>	14
Abbildung 4: Plattenbelegung Spiking-Experimente und Patientenproben	20
Abbildung 5: Amplifikationskurve von CCNE2 (Platte 1, HEC-1A).....	34
Abbildung 6: Kurve der relativen Quantifizierung für CCNE2	35
Abbildung 7: Amplifikationskurve von MAL2 (Platte 1, HEC-1A)	35
Abbildung 8: Kurve der relativen Quantifizierung für MAL2.....	36
Abbildung 9: Amplifikationskurve von CK19 (Platte 2, HEC-1A).....	37
Abbildung 10: Kurve der relativen Quantifizierung für CK19	38
Abbildung 11: Amplifikationskurve von Mig-7 (Platte 1, HEC-1A)	39
Abbildung 12: Kurve der relativen Quantifizierung für Mig-7	40
Abbildung 13: Kurven der relativen Quantifizierung der Tumormarker für HEC-1A-Zellen	40
Abbildung 14: Säulen der relativen Quantifizierung der Tumormarker für HEC-1A-Zellen.....	41
Abbildung 15: Kurven der relativen Quantifizierung der Tumormarker für RL95-2-Zellen	41
Abbildung 16: Säulen der relativen Quantifizierung der Tumormarker für RL95-2-Zellen	42
Abbildung 17: Screenshot Programm Quantity One Myco_Test	43
Abbildung 18: Expression von CCNE2 und MAL2 in Patientenproben	49
Abbildung 19: Expression von CK19 und Mig-7 in Patientenproben.....	49
Abbildung 20: Ablauf der EMT <i>Quelle: [129]</i>	54
Abbildung 21: Beitrag der EMT zur Krebsprogression <i>Quelle: [129]</i>	54

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM/FIGO-Klassifikation beim Endometriumkarzinom <i>Quelle: [1]</i>	4
Tabelle 2: Stadienabhängige Therapie des Endometriumkarzinoms	6
Tabelle 3: Temperaturprotokoll der PCR	21
Tabelle 4: Patientendaten	25
Tabelle 5: Konzentrationen und Ratios der Spiking-RNA	30
Tabelle 6: Daten RT-PCR für 18S	31
Tabelle 7: Daten RT-PCR für GAPDH	32
Tabelle 8: Daten RT-PCR für CK20	33
Tabelle 9: Daten RT-PCR für CCNE2	34
Tabelle 10: Daten RT-PCR für MAL2	36
Tabelle 11: Daten RT-PCR für CK19	37
Tabelle 12: Daten RT-PCR für Mig-7	39
Tabelle 13: Konzentrationen und Ratios der Patienten-RNA	44
Tabelle 14: Relative Quantifizierung von MAL2 in Patientenproben	45
Tabelle 15: Relative Quantifizierung von CCNE2 in Patientenproben	45
Tabelle 16: Relative Quantifizierung von Mig-7 in Patientenproben	46
Tabelle 17: Relative Quantifizierung von CK19 in Patientenproben	47
Tabelle 18: Übersicht Patientenwerte der relativen Quantifizierung von CK19 und Mig-7	48
Tabelle 19: Einteilung der Patientinnen in Subgruppen	50
Tabelle 20: Statistischer Vergleich der Genexpression in verschiedenen Subgruppen	51

6.4 Abkürzungsverzeichnis

APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
CCNE2	Cyclin E2
cDNA	copy-DNA
CK	Cytokeratin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle over Threshold”
CTC	Circulating Tumour Cell
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	Disseminated Tumour Cell
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ER α	Estrogenrezeptor- α
FDA	Food and Drug Administration
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
MAL2	Myelin and lymphocyte protein gene 2
MEM	Modified Eagle Medium
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
Mig-7	Migrating inducting gene 7
NUCKS	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCO	Polyzystisches Ovar
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RQ	Relative Quantifizierung
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-time Polymerase-Kettenreaktion
UICC	Union for International Cancer Control
WHO	World Health Organisation

6.5 Material und Geräte

Reagenzien:

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Trypan-Blau 20 ml	TRYPAN BLUE SOLUTION (0,4%) Prepared in 0,81% sodium chloride and 0,06% potassium phosphate, dibasic	Sigma Aldrich Chemie GmbH St. Louis, USA
Histopaque 500 ml	HISTOPAQUE®-1077 sterile-filtered, density: 1.077 g/ml, Produktnummer 10771	Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, Missouri, USA
PBS-Lösung 1000 ml	Phosphat Buffered Saline Dulbecco w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺ Cat.-No.: L 1820	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Trizol-Lösung 200 ml	TRIZOL® Reagent Cat.-No.: 15596-026	Life Technologies Carlsbad, California, USA
Chloroform-Reagenz 250 ml	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur Chloroform for analysis	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur 2-Propanol for analysis	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Ethanol absolut for analysis	Mallinckrodt Baker B.V. Deventer, Niederlande
RNAse freies H₂O 1000 ml	Aqua ad iectabilia, Wasser für Injektionszwecke	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Primer zur Umschreibung in cDNA (oligo-dTs) 50 µl	Super Script® III First Strand Synthesis Super Mix 50rxn Cat.-No.: 18080-400 Oligo (dT) ₂₀ 50µM	Invitrogen by Life Technologies Carlsbad, California, USA
Puffer zur Umschreibung in cDNA	Super Script® III First Strand Synthesis Super Mix 50rxn	Invitrogen by Life Technologies

50 µl	Cat.-No.: 18080-400 Annealing Buffer	Carlsbad, California, USA
Reaction Mix zur Umschreibung in cDNA 500 µl	Super Script® III First Strand Synthesis Super Mix 50rxn Cat.-No.: 18080-400	Invitrogen by Life Technologies Carlsbad, California, USA
Enzyme Mix zur Umschreibung in cDNA 100 µl	Super Script® III First Strand Synthesis Super Mix 50rxn Cat.-No.: 18080-400 RNase OUT™ Mix	Invitrogen by Life Technologies Carlsbad, California, USA
Primer 18S 250 µl	TaqMan® Gene Expression Assays 20xMix HS03003631_g1	Applied Biosystems® by Life technologies Carlsbad, California, USA
Primer GAPDH 250 µl	TaqMan® Gene Expression Assays HS	Applied Biosystems® by Life technologies Carlsbad, California, USA
Primer CK19 250 µl	TaqMan® Gene Expression Assays HS00761767_s1	Applied Biosystems® by Life technologies Carlsbad, California, USA
Primer CK20 250 µl	TaqMan® Gene Expression Assays HS00300643_m1	Applied Biosystems® by Life technologies Carlsbad, California, USA
Primer CCNE2 250 µl	TaqMan® Gene Expression Assays HS00180319_m1	Applied Biosystems® by Life technologies Carlsbad, California, USA
Primer MAL2 250 µl	TaqMan® Gene Expression Assays HS00294541_m1	Applied Biosystems® by Life technologies Carlsbad, California, USA
Primer Mig-7 250 µl	TaqMan® Gene Expression Assays HS00706258_s1	Applied Biosystems® by Life technologies Carlsbad, California, USA
MasterMix	TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) 250 reactions	Applied Biosystems® by Life technologies Carlsbad, California, USA

Zellkultur-Medium	Dulbecco's MEM with stable glutamine, low endotoxin with 3.7 g/l NaHCO ₃ , with 4.5 g/l D-glucose Cat. No. FG 0445	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Fetal Bovine Serum 500 ml	FETAL BOVINE SERUM Cat.-No.: S0115	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 5 ml	Penicillin/Streptomycin 10000U/ml/10000µg/ml Cat.-No.: A2210	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung 100 ml	Trypsin/EDTA Solution 0,05%/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Zelllinie HEC-1A	HTB-112™,HEC-1A Endometrial Carcinoma Human	ATCC®, Wesel, Deutschland
Zelllinie RL95-2	CRL-1671™, RL95-2 Endometrial Carcinoma Human	ATCC® Wesel, Deutschland
Mycoplasmen-Test-Kit 20 Tests	PCR Mycoplasma Test Kit Cat.-No.: A3744 0020	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Agarose-Gel 18 Stück	2 % Agarose-Gel Cat.-No.: G5018-02	Invitrogen by Life Technologies Carlsbad, California, USA
Mycoplasmen-Marker 50 µg	Marker VIII, DNA-Längenstandard VIII= 19-1114bp Cat.-No.: 1336045	Roche Applied Science Penzberg, Deutschland
Ladepuffer Mycoplasmentest 10 Stück	Blue Juice™ Gel Loading Buffer Cat.-No.: 10816-015	Invitrogen by Life Technologies Carlsbad, California, USA

Verbrauchsmaterial:

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
EDTA Blutentnahmeröhrchen 10 ml	BD Vacutainer® EDTA Röhrchen K ₂ EDTA (1,8mg/ml) (16x100mm) REF 367525	Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, New Jersey, USA
Flügelkanüle	BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set (0,8x19x305mm) REF 367286	Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, New Jersey, USA
Einmalhalter (Blister)	BD Vacutainer® Holders REF 364815	Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, New Jersey, USA
Neubauer-Zählkammer mit Deckglas 0,100 mm Tiefe	Neubauer improved- Zählkammer mit aufgelegtem Deckglas	LO Laboroptik GmbH Friedrichsdorf, Deutschland
FALCON-Röhrchen 50 ml	CELLSTAR® TUBES, PP, graduated conical bottom, blue screw cap, sterile Cat.-No.: 227261	Greiner Bio-One AG Kremsmünster, Österreich
RNAse freies Tube 1,5 ml/1,7ml 1000 Stück	Multi®-SafeSeal®Tubes farblos PP Füllvolu- men/Nennvolumen 1,5/1,7 ml	Carl Roth GmbH+Co.KG Karlsruhe, Deutschland
PCR Platte 20 Stück	MicroAmp Fast Optical 96- Well Reaction Plate with Barcode, 0,1 mL	Applied Biosystems® by Life technologies Carlsbad, California, USA
PCR Abdeckfolie 100 Stück	MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems® by Life technologies Carlsbad, California, USA
Zellkulturflaschen 75 cm²	Zellkulturflaschen mit Filter-Schraubklappen	TPP Techno Plastic Prod- ucts AG Trasadingen, Schweiz

Geräteliste:

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Tischzentrifuge	Multifuge 3SR+/3L-R	Thermo Fisher Scientific Waltham,Massachusetts, USA
Minizentrifuge	Centrifuge 5415	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Hera Freeze	Thermo Electron Corporation Waltham, Massachusetts, USA
Gefrierschrank -20°C	Bosch Cooler	Robert Bosch GmbH Gerlingen, Deutschland
Photometer	Nanodrop	Implen München, Deutschland
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
CO₂-Inkubator	Thermo Scientific HeraCell 150i CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific Waltham,Massachusetts, USA
Sicherheitswerkbank	HeraSafe, Heraeus Instru- ments	Thermo Fisher Scientific Waltham,Massachusetts, USA
Real-Time-PCR-Gerät	7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems Carbad, Kalifornien,USA

6.6 Ethikantrag

17.Sep.2012 09:26 +089 5160 5192

Ethikkommission der LMU

#246/ P.001 /001



ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission Pettenkoferstr. 8 - 80336 München

Herrn
Prof. Dr. Udo Jeschke
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
Maistr. 11
80337 München

Vorsitzender:
Prof. Dr. W. Eisenmenger
Telefon+49 (0)89 5160 - 5191
Telefax+49 (0)89 5160 - 5192
Ethikkommission@
med.uni-muenchen.de

www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Pettenkoferstr. 8a
D-80336 München

Hausanschrift:
Pettenkoferstr. 8
D-80336 München
München, 10.05.2012 EM /sc

Titel:	Krebsfrüherkennung bei gynäkologischen Tumoren
Antragsteller:	Prof. Dr.. U. Jeschke, Dr. U. Andergassen
Projekt- Nr.	148-12

Sehr geehrter Herr Kollege Jeschke,
sehr geehrter Herr Kollege Andergassen,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 06.05.2012 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (EK- Antrag, Patienten- Information u. – Einverständniserklärung).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. W. Eisenmenger
Vorsitzender der Ethikkommission

N/ Mitglieder der Ethikkommission

P.S.: Bitte beachten Sie die aktuellen Richtlinien für Anträge an die Ethikkommission.
Internetadresse: www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Mitglieder der Kommission:
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. G. Paumgartner (stellv. Vorsitzender), PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. H. M. Müller, Prof. Dr. R. Pennig, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zach

Poster und Veröffentlichung

- Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde e.V. (BGGF) im Juli 2014 in Regensburg, Teilnahme mit dem Posterbeitrag

Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen beim Endometriumkarzinom mittels RT-qPCR

- Kölbl A., Wellens R., Koch J., Rack B., Hutter S., Friese K., Jeschke U., Andergassen U.

Endometrial Adenocarcinoma: Analysis of Circulating Tumour Cells by RT-qPCR.

Anticancer Res. 2016 Jun; 36(6):3205-3209.

Eidesstattliche Erklärung

Rebekka Wellens

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Endometroides Adenokarzinom: Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) mit Hilfe von spezifischen Real-Time PCR Markern

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Passau, den 3. April 2018

Rebekka Wellens

Danksagung

Die Entstehung dieser Arbeit möglich gemacht haben viele Personen, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

An erster Stelle möchte ich Professor Dr. Udo Jeschke nennen. Ich danke ihm ganz herzlich für die Möglichkeit der Promotion, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und die wertvollen wissenschaftlichen Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Dr. Ulrich Andergassen. Durch die Überlassung des Themas habe ich es ihm zu verdanken, dass diese Dissertation entstehen konnte. Mit seiner klinischen Erfahrung und wissenschaftlichen Expertise auf dem Gebiet der gynäkologischen Onkologie stand er immer mit Rat und Tat zur Seite und gab die richtigen Impulse. Meinen aufrichtigen Dank für diese außergewöhnliche Betreuung.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Alexandra Kölbl. Sie führte mich in die Laborarbeit ein und hatte stets ein offenes Ohr für alle Anliegen und Probleme. Es fehlte ihr trotz ihres enormen Arbeitspensums nie an Geduld oder Ausdauer und sie gab stets die wegweisenden Denkanstöße und ehrliches Feedback. Dafür meine ausdrückliche Bewunderung und meinen uneingeschränkten Dank.

Danken möchte ich darüber hinaus Herrn Julian Koch für die Hilfe bei der Organisation der Patientinnenproben.

Ich möchte auch den Mitarbeiterinnen des tumorimmunologischen Labors, insbesondere Frau Leonie Majunke, Frau Beate Zill und Frau Alvera Rengel-Puertas, ganz herzlich für ihre stetige Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Tobias Thormeyer danke ich besonders für die Unterstützung bei der Durchführung der Statistik.

Meinen Laborkollegen Dominik und Anja danke ich für ihren Beistand sowohl zu Zeiten der experimentellen Arbeit als auch danach, aus Kollegen wurden Freunde.

Nicht zuletzt danken möchte ich Alexander für seine moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums und auch im Rahmen der Dissertation. Widmen möchte ich diese Arbeit meinen beiden Eltern. Ohne ihren Rückhalt zu jeder Zeit wäre all dies nicht möglich gewesen. Meinen allerherzlichsten Dank.