

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die verwendeten Materialien sind im folgenden in Tabellenform aufgeführt. Alle Chemikalien, Lösungsmittel und Zusätze sind, wenn nicht anders beschrieben, von der Firma Sigma, Steinheim oder Merck, Darmstadt in der höchsten Reinheitsstufe bezogen.

Tab. 2.1 Geräte

Gelelektrophoresekammern Horizon 58	GibcoBRL, Karlsruhe
Elektrophoreseausstattung Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, München
Feinwaage Universal	Sartorius, Göttingen
Inkubator CO2-AUTO-ZERO	Heraeus, Berlin
Kühlbox	Roche Diagnostics, Mannheim
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Laborwaage Sac 52	SCALTEC, Heilgenstadt
Light Cycler	Roche Diagnostics, Mannheim
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrowelle Moulinex	Moulinex, Solingen
Neubauer Zählkammer	Zeiss, Jena
PCR Thermocycler MultiCycler PCT 200	Biozym, hess. Oldendorf
Photometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipettierhilfe Eppendorf-Pipette	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt
Schüttler GFZ 3018	Dunn Labortechnik, Asbach
Sofortbildkamera Polaroid	Polaroid, Offenbach
Template Tamer	Oncor Appligene, Heidelberg,
Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermomixer Eppendorf 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg

Ultraschallstab	Bandelin electronic, Berlin
UV Schirm Reprostar II	Lamag, Berlin
Vortexer VF 2	IKA-Labortechnik
Wasserbad	Merck Eurolab, Berlin

Tab. 2.2 Verbrauchsmaterialien

Pipettenröhrchen	BD Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen	Brand GmbH, Wertheim
Phase Lock Gel-Tubes	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	BD Falcon, Heidelberg
Röntgenfilme, Biomax Mr	Kodak, Stuttgart
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen	NUNC, Karlsruhe
Zellkulturschaber	NUNC, Karlsruhe

Tab. 2.3 Reagenzien

Agarose	Biozym, Hessisch-Oldendorf
BPB	Sigma, Steinheim
DMSO	Sigma, Steinheim
DNA-Größenmarker, 1 Kb DNA Ladder	GibcoBRL, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
FCS	GibcoBRL, Karlsruhe
Glutamax	GibcoBRL, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
GTC	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Sigma, Steinheim
LB Medium Amp.	GibcoBRL, Karlsruhe
LB Agar Platten Amp.	GibcoBRL, Karlsruhe
MESA-Puffer	Sigma, Steinheim
Na-Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
dNTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligo-dT-Primer	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligo-hexamer-Primer	Roche Diagnostics, Mannheim

PBS Dulbecco,s w/o Calcium und Magnesium	GibcoBRL, Karlsruhe
PCR-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin	GibcoBRL, Karlsruhe
Phenol	Biometra, Göttingen
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Polyadenylic Acid	Pharmacia Biotech
Primer	Metabion, Planegg-Martinsried
RPMI	GibcoBRL, Karlsruhe
SOC Medium	GibcoBRL, Karlsruhe
Sonden	TIB Molbiol, Berlin Metabion, Planegg-Martinsried
Streptomycinsulfat	GibcoBRL, Karlsruhe
TBE-Puffer	GibcoBRL, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Steinheim

Tab. 2.4 Enzyme

DNase	Qiagen, Hilden
Eco R I	MBI Fermentas; Göttingen
Eco R V	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin	GIBCO, Karlsruhe/Heidelberg

Tab. 2.5 Zelllinien

CACO2	Cell line service, Heidelberg
COLO205	American Type Culture Collection, Manassas, USA
CX2	Cell line service, Heidelberg
CX94	Cell line service, Heidelberg
HCT116	American Type Culture Collection, Manassas, US
HT29	American Type Culture Collection, Manassas, USA
LS-174-T	Cell line service, Heidelberg

Tab. 2.6 Kits

EPIMET Epithelial Cell Detection Kit	Baxter, Unterschleißheim
High Pure RNA Isolation Kit	Boehringer Mannheim
LightCycler-DNA Master Hybridization Probes	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler-DNA FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche Diagnostics, Mannheim
NEXELL ICC Staining Kit	Nexell Therapeutics Inc.
Omniscript Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Hilden
Puregene DNA Isolation Kit	Gentra Systems, Minneapolis, USA
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy MiniKit	Qiagen, Hilden
RNeasy MidiKit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, NL

2.2 Probengewinnung und Probenkonservierung

2.2.1 Blutproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 237 Blutproben von 129 Patienten mit Kolon- oder Rektum-Karzinomen untersucht. 113 der Patienten wurden zum Zeitpunkt der Probenentnahme im UKBF und die restlichen 16 in einer onkologischen Praxis behandelt. Das Krankheitsstadium wurde nach den Empfehlungen der UICC (Union International Contre le Cancer) festgelegt. 92 der Patienten wurden in kurativer Absicht operiert und die Blutentnahmen erfolgten präoperativ am Tag der Operation. Für 19 Patienten konnten weitere Blutproben eine Woche nach der Operation gesammelt werden. 37 Patienten mit Tumorstadien III oder IV erhielten zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Chemotherapie mit Zytostatika bzw. eine Vaccinierung, entweder in adjuvanter Form nach vorangegangener Operation oder nach Diagnose von Fernmetastasen. 10 dieser Patienten wurden mehrfach im Abstand von mindestens einer Woche untersucht. Desweiteren wurden 45 Blutproben von gesunden Spendern sowie 16 Blutproben von 13 Patienten mit Infektionskrankheiten oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als Referenzproben gewonnen. Für methodologische Experimente und Zellverdünnungsreihen wurden weitere Blutproben von gesunden Spendern verarbeitet. 142 der Patienten-Blutproben wurden von der Autorin komplett aufgearbeitet. Von den verbliebenen Blutproben konnte die bereits

existierende cDNA (Aufarbeitung durch Labor-Mitarbeiter im Rahmen vorangegangener Projekte) genutzt werden.

Für alle Blutentnahmen wurde das vorherige Einverständnis des Spenders eingeholt. Bei der Blutentnahme wurden ein oder zwei EDTA-Röhrchen mit jeweils 10ml Blut gewonnen. Die Verarbeitung der Blutproben erfolgte innerhalb von 2 Stunden nach Probenentnahme. 10ml Blut wurden in ein 50ml Falcon-Röhrchen gegeben und 10min bei 1600g zentrifugiert. Danach wurde das Serum abpipettiert, der Zellrückstand in 5ml GTC Puffer gelöst und die so stabilisierte Probe bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Knochenmark

Von 10 Patienten, die in kurativer Absicht operiert wurden, konnte zusätzlich Knochenmark gewonnen werden. Die Patienten wurden im Vorfeld umfangreich über den Eingriff aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Knochenmarkspunktion aus dem Beckenkamm erfolgte direkt präoperativ in Vollnarkose. Pro Patient wurden 2ml bis 10ml Knochenmark erhalten. Als Referenzproben konnte Knochenmark von 21 Patienten, die aus anderen Gründen punktiert wurden, genutzt werden. Die Sammlung des Knochenmarks erfolgte ebenfalls in 10ml EDTA-Röhrchen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte äquivalent zum Blut, mit der Ausnahme, daß die Menge des GTC-Puffers der Knochenmarksmenge angepaßt wurde (Volumen GTC = $0.5 \times$ Volumen Knochenmark).

2.2.3 Gewebe

Im Rahmen der operativen Tumorentfernung wurden Gewebsproben von 15 Patienten mit einem Kolonkarzinom (pathologisch als Adenokarzinome klassifiziert) und 4 Proben aus unauffälliger Dickdarmschleimhaut erhalten. Das Probenmaterial wurde zur Vermeidung von RNA-Verunreinigungen unter sterilen Bedingungen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.4 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (COLO205, LS-174-T, CX2, CX94, HCT116, HT29, CaCo2) wurden freundlicherweise vom Labor Dr. Scheibenbogen zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien waren in flüssigem Stickstoff (etwa 10^6 Zellen in 500 μl FCS) konserviert. Alle Arbeiten wurden mit sterilen Materialien unter einer Sterilarbeitsbank durchgeführt. Zur Zellzucht wurde ein modifiziertes RPMI-Medium, bestehend aus RPMI mit 10% FCS, 104U/ml Penicillin, 105 $\mu\text{g}/$

ml Streptomycinsulfat, 1.04mM Na-Pyruvat, 3ml Glutamax und 3ml Phenolrot, verwendet. Nach erfolgreicher Anzucht wurden die Zelllinien weiter in 50ml Kulturflaschen jeweils mit 20-30ml Medium bei 37°C und 3.5% Kohlendioxid der Raumluft in einem Brutschrank gezogen. Das Umsetzen der Kulturen erfolgte alle drei Tage. Da die verwendeten Zelllinien adherent wachsen, war dazu die Inkubation mit trypsinhaltiger Lösung erforderlich, um die Zellen in Suspension zu überführen. Die adherenten Zellen wurden mit PBS gespült, um Medium-Reste zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 10ml 0.25%iger Trypsin-Lösung gespült und mit 3ml derselben Trypsin-Lösung für etwa 10min unter Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 10ml Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wurde 5min bei 500g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen normal mit 10ml Medium gewaschen. 1-2 ml der Suspension wurden schließlich in eine mit 20 ml Medium gefüllte 50ml-Kulturflasche zur weiteren Zucht gegeben.

2.2.5 Zellverdünnungsexperimente

Für Zellverdünnungsexperimente wurden COLO205-Zellen nach oben genannter Methode vereinzelt, gewaschen, schrittweise in PBS verdünnt und mit jeweils 10ml Vollblut von gesunden Spendern vermischt. Die so manipulierten Blutproben enthielten zwischen 1 und 10^6 Tumorzellen und wurden nach oben genanntem Protokoll weiter verarbeitet.

2.3 Nachweis von RNA-Markern mittels Polymerasekettenreaktion

Der Nachweis von RNA-Transkripten in intakten Zellen erforderte die Isolierung der RNA, die Umschreibung der mRNA in cDNA und den Nachweis der cDNA mittels PCR. Im folgenden sind die Schritte einzeln erklärt.

2.3.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erforderte Material-spezifische Aufbereitungsschritte, um eine Zell-Lyse sowie die Beseitigung von Verunreinigungen zu erreichen. Die Zell-Lyse erfolgte jedoch immer im Beisein von Guanidin-Isothiozyanat zur effektiven Inaktivierung von RNasen. Für die weitere Aufreinigung mittels ethanolhaltiger Waschpuffer wurden Säulen verwendet, die mit einer auf RNA-Bindung optimierten Membran ausgestattet sind. Verbliebene DNA-Reste wurden durch die Inkubation mit einer DNase-haltigen Lösung entfernt. Die gereinigte RNA wurde schließlich mit RNase-freiem Wasser in ein steriles 1,5ml-Eppendorf-Gefäß eluiert. Um die

Intaktheit der gewonnenen RNA zu überprüfen (sichtbare Bande der 18s und 28s rRNA), wurden 5µl RNA-Lösung mit 5µl Bromphenolblau versetzt und auf ein 1%iges Agarose-Gel (hergestellt mit MESA 1x und 1µl Ethidiumbromid/20ml Gel) aufgetragen (Abb. 2.1, 2.2). Desweiteren wurden 2µl RNA-Lösung 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt und die RNA-Konzentration bei 260nm und 280nm photometrisch bestimmt ($A_{260}=1$ entspricht 40ng/µl RNA). Die verbliebene RNA-Lösung wurde sofort bei -80°C eingefroren.

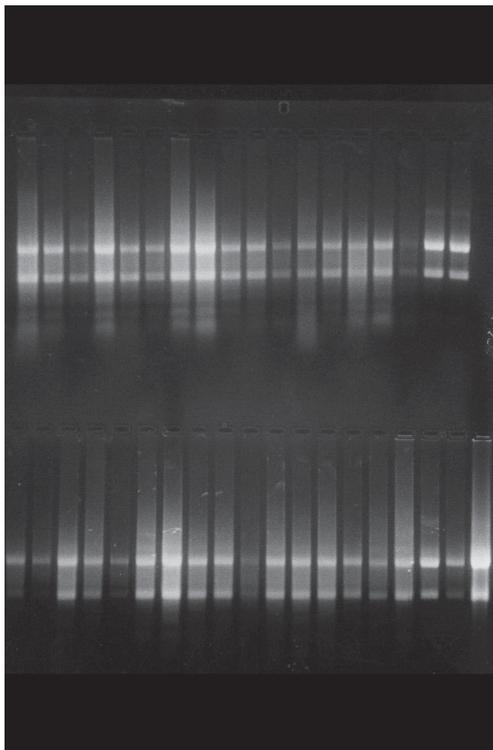


Abb. 2.1 Auftragung von RNA-Lösungen aus Blutproben und Zelllinien (jeweils die 2 letzten Banden rechts) auf ein Agarose-Gel.

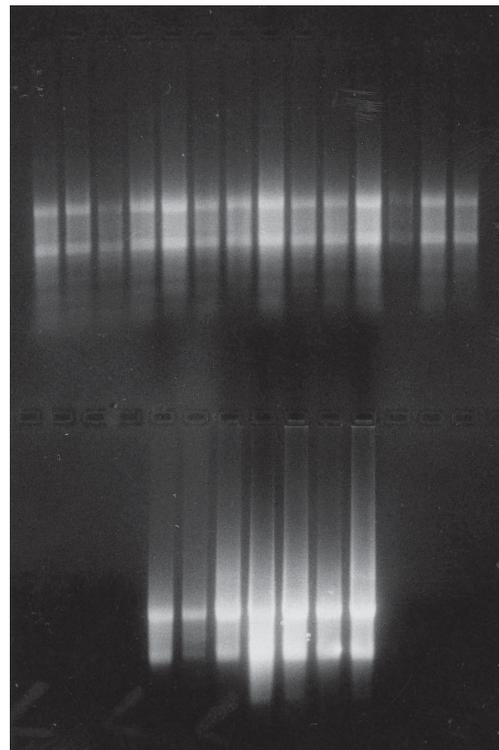


Abb. 2.2 Auftragung von RNA-Lösungen aus Blutproben (oben) und Knochenmarksproben (unten) auf ein Agarose-Gel.

2.3.1.1 Blut und Knochenmark

Die RNA-Isolierung aus peripheren Blutproben erfolgte nach der Methode der Guanidinium Thiozyanat/Phenol Chloroform – Extraktion (Chomczynski 1987). Die mit GTC-Puffer stabilisierten und tiefgefrorenen Proben wurden zur weiteren Verarbeitung schonend auf Eis aufgetaut. Unter einem Abzug wurden die Proben jeweils mit 6ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,5ml Na-Acetat (2M, pH 4,2) versetzt und in ein 50ml „phase lock gel“-

Tube, dessen Gel zuvor 2min bei 1600g herunterzentrifugiert wurde, umgefüllt. Nach 10min Zentrifugation bei 2890g erschien die wässrige Phase oberhalb und die organische Phase unterhalb des Gels. Der wässrige Überstand wurde in ein 50ml Tube dekantiert und die gleiche Menge (etwa 7,5ml) Isopropanol zugegeben. Zur Ausfällung der Nukleinsäuren wurde die Lösung nun entweder 30min bei -50°C oder -80°C , 2h bzw. bis zu 24h bei -20°C gelagert und danach 30min bei 4500g und 4°C zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung folgte den Angaben des High Pure RNA Isolation Kits. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in 200 μl PBS und 400 μl Lysepuffer resuspendiert. Die Mischung wurde auf eine Säule aufgetragen. Durch Zentrifugation für 15s bei 8000g (Tischzentrifuge) wurden die Nukleinsäuren an eine Glasfaservlies-Membran gebunden. Zur Beseitigung der DNA-Reste wurden 90 μl DNase-Puffer und 10 μl DNase gut gemischt, auf die Säule geben und der Ansatz 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten mehrere Reinigungsschritte mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern 1 und 2 sowie die Elution mit 50 μl Elutionspuffer durch Zentrifugation für 1min bei 8000g.

2.3.1.2 Gewebe

Die RNA-Isolierung aus Gewebe erfolgte mit dem RNeasy Midi-Kit. Das tiefgefrorene Gewebe wurde mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und etwa 50mg sofort in 3ml GTC-Puffer gegeben. Zur weiteren Gewebszerkleinerung wurde das Gemisch dreimal mittels eines Ultraschallstabes (freundlicherweise von Prof. Ullrich (Gastroenterologie, UKBF) zur Verfügung gestellt) für jeweils 5s mit einem Interwall von 10s auf Eis beschallt und danach 2-3min zur weiteren Zellzerstörung kräftig gemischt (Vortexer). Die Mischung wurde danach 5min bei 8000g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß übertragen. Nach Zugabe einer äquivalenten Menge 70%igen Ethanol und kräftiger Durchmischung wurden die Nukleinsäuren sukzessive an eine Silikon-Gel-Membran gebunden, indem jeweils 3,8ml der Lösung auf eine Säule gegeben, 5min bei 8000g zentrifugiert und der Durchfluß verworfen wurde. Nach Auftragen von 2ml RW1-Puffer und Zentrifugation für 5min bei 8000g wurden 140 μl RDD-Puffer (DNase-Inkubationspuffer, Qiagen) und 20 μl DNase (2,7U/ μl) gut gemischt, auf die Säule geben und der Ansatz 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten mehrere Reinigungsschritte mit Guanidin- und Ethanol-haltigen Puffern (RW1, RPE) sowie die Elution mittels 150 μl RNase freien Wassers durch Zentrifugation für 3min bei 8000g.

2.3.1.3 Zelllinien

Die RNA-Isolierung aus Zelllinien erfolgte mit dem RNeasy Mini-Kit. Entsprechend der oben beschriebenen Methode wurden die Zellen mit Trypsin vereinzelt und zweimal in PBS gewaschen. Nach Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer wurden 10^6 Zellen mit 1ml GTC-Puffer versetzt und 2-3min mittels eines Vortexers kräftig gemischt. Nach Zugabe einer äquivalenten Menge 70%igen Ethanol und kräftiger Durchmischung wurden die Nukleinsäuren sukzessive an eine Silikon-Gel-Membran gebunden, indem jeweils 700 μ l der Lösung auf eine Säule gegeben, 15s bei 8000g zentrifugiert und der Durchfluß verworfen wurde. Nach Auftragen von 350 μ l RW1-Puffer und Zentrifugation für 15s bei 8000g wurden 70 μ l RDD-Puffer (DNase-Inkubationspuffer, Qiagen) und 10 μ l DNase (2,7U/ μ l) gut gemischt, auf die Säule geben und der Ansatz 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten mehrere Reinigungsschritte mit Guanidin- und Ethanol-haltigen Puffern (RW1, RPE) sowie die Elution mittels 50 μ l RNase freien Wasser durch Zentrifugation für 3min bei 8000g.

2.3.2 cDNA-Synthese

Im Standard-Fall wurden die RNA-Lösungen auf eine RNA-Konzentration von 2 μ g RNA/15 μ l RNase-freies Wasser verdünnt, jeweils 15 μ l in ein steriles 1,5ml Eppendorf-Gefäß gegeben, 5min bei 65°C inkubiert und danach etwa 5min auf Eis abgekühlt. Falls die photometrisch bestimmte RNA-Konzentration kleiner als im Standard-Fall war, wurde die RNA-Lösung unverdünnt verarbeitet. In 54 Fällen wurde eine höhere RNA-Konzentration (2-6 μ g RNA/15 μ l Wasser, in Einzelfällen auch mehr) verwendet. Die weitere cDNA-Synthese erfolgte mit dem Omniscript Reverse Transcriptase Kit entsprechend den Angaben des Herstellers. Pro Ansatz wurde eine 7,5 μ l umfassende Mischung aus 2 μ l oligo-p(dT)₁₅ Primer (0,8 μ g/ μ l) oder 2 μ l oligo-hexamer-Primer (0,4 μ g/ μ l), 2 μ l dNTP (5mM), 0,5 μ l RNase-Inhibitor (40U/ μ l), 1 μ l Omniscript Reverse Transcriptase (4,5U/ μ l), 2 μ l Omniscript-Puffer (x10) vorbereitet und der RNA-Lösung zugefügt, so daß sich ein Endvolumen von 22,5 μ l ergab. Für die Ansätze mit höherer RNA-Konzentration wurde die Enzymkonzentration pro Ansatz erhöht: bei RNA-Mengen von 2-4 μ g/Ansatz -> 2 μ l Enzym und bei RNA-Mengen von >4 μ g/Ansatz -> 3 μ l Enzym, so daß sich das Ansatzvolumen auf 23,5 μ l bzw. 24,5 μ l erhöhte. Jeder RNA-Probe wurde eine -RT-Kontrolle zugeordnet, wobei der entsprechende Reaktions-Mix anstatt der reversen Transkriptase RNase-freies Wasser enthält. Zusätzlich wurde zu jeder cDNA-Synthese ein Ansatz ohne RNA hergestellt, bei dem der Reaktions-Mix in 15 μ l RNase-freies Wasser gegeben wurde. Weiterhin wurden bei

hoher RNA-Ausbeute aus praktischen Gründen ein "Skaling-up" durchgeführt, wobei 2 bis 10 Ansätze in einem Eppendorf-Gefäß weiterverarbeitet wurden. Die Ansätze wurden eine Stunde bei 37°C und anschließend noch 5 min bei 95°C zur Inaktivierung der reversen Transkriptase inkubiert. Die fertige cDNA wurden bei -20°C gelagert.

2.3.3 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion wurde mit dem LightCycler unter Verwendung des "LightCycler Faststart DNA Master Hybridization Probes" Kits durchgeführt. Das Prinzip der PCR, nämlich eine Aufeinanderfolge von 3-phasischen Zyklen (Denaturierung, Annealing, Elongation), die die exponentielle Vervielfältigung einer definierten DNA-Sequenz bewirken, liegt auch dieser neuen Methode zugrunde. Die Besonderheit besteht allerdings darin, daß dem Reaktionsansatz selektiv an das Reaktionsprodukt bindende Sonden zugefügt werden, die die Quantifizierung des Produkts und die simultane Beobachtung des Reaktionsablaufs ermöglichen. Die Sonden sind Oligonukleotide, die benachbart (max. 5 Nukleotide voneinander entfernt) am Amplifikat binden. Eines der Nukleotide trägt einen Donor Fluoreszenz-Farbstoff am 3'-Ende (Fluorescein) und das andere einen Akzeptor-Farbstoff am 5'-Ende (LC Red 640) und eine Phosphorylierung am 3'-Ende. Wenn beide Sonden an ein DNA-Molekül binden, wird Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge emittiert und durch den LightCycler detektiert. Damit ist neben der Quantifizierung auch die Spezifität des Produktes gesichert. Die PCR-Reaktion findet in Glaskapillaren statt, die über Luft erwärmt werden, was eine beträchtliche Verkürzung der einzelnen PCR-Zyklen im Vergleich zur konventionellen PCR gestattet.

Um das Kontaminations-Risiko minimal zu halten, wurden alle Arbeiten mit PCR-Amplifikaten in einem anderen Labor, d.h getrennt von RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR-Vorbereitung durchgeführt. Außerdem erfolgte die Mischung der PCR-Reagenzien in einem "template tamer".

Jede Glaskapillare enthielt ein Endvolumen von 20µl, wobei zuerst 18µl PCR-Mix ohne cDNA, bestehend aus: 1µl des Forwärts-Primers (10µM), 1µl des Rückwärts-Primers (10µM), jeweils 1µl der Sonden (4µM), 2µl der Enzym-Mischung und 12µl einer MgCl₂-Lösung (Marker-spezifische Mg-Konzentration) in jede Kapillare pipettiert wurden, und danach 2µl der cDNA-, -RT-Lösung oder Wasser zugegeben wurde. Nach Verschließen der Kapillaren wurden diese kurz zentrifugiert und zügig in den LightCycler überführt. Jeder PCR-Lauf besteht aus vier Teilprogrammen: Denaturierung (10min bei 95°C), Amplifikation (Marker-abhängig siehe

Kapitel 3), abschließende Extension (2min bei 72°C) und Kühlung (1min bei 40°C). Die Etablierung der PCR-Reaktionen für die einzelnen RNA-Marker sind im Kapitel 3 aufgeführt.

Jeder PCR-Lauf enthielt Standards dreier verschiedener Konzentrationen zum Quantifizieren sowie als Positiv-Kontrollen, eine -RT-Kontrolle zu jeder cDNA-Probe und eine Wasser-Kontrolle als Negativ-Kontrolle. Alle cDNA-Proben wurden, soweit das Material ausreichte, doppelt analysiert.

2.3.4 Herstellung eines PCR-Standards

Zur Herstellung eines PCR-Standards wurde die entsprechende Sequenz mittels konventioneller PCR und Taq-Polymerase vervielfältigt und in ein Plasmid kloniert. Das Plasmid wurde dann in Bakterien transformiert und kann somit jederzeit vervielfältigt werden.

2.3.4.1 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wurde im Thermocycler MultiCycler PCT 200 durchgeführt, wobei cDNA von Kolongewebe als Quelle genutzt wurde. Mit denselben Vorkehrungen wie bei der qPCR wurde folgender Mix (49,5µl) hergestellt: 5µl Puffer, 1µl des Forwärts-Primers (10µM), 1µl des Rückwärts-Primers (10µM), 5µl dNTP (2mM), 35µl RNase-freies Wasser, 0,5µl Tag-Polymerase und 2µl Probe (cDNA, -RT, oder Wasser). Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: Denaturierung (2min bei 95°C), Amplifikation 50 Zyklen (45s bei 94°C, 45s bei Marker-spezifischer Annealing-Temperatur, 50s (+1s pro Zyklus) bei 72°C), abschließende Extension (10min bei 72°C) und Kühlung (4°C).

2.3.4.2 Reinigung des PCR-Produktes

Die cDNA wurde 3-fach amplifiziert und die Produkte zusammengemischt (148,5µl). 10µl des Amplifikats wurden mit 5µl BPB versetzt und auf ein Agarose-Gel (hergestellt mit TBE 0,5x und 1µl Ethidiumbromid/20ml Gel) zur Ergebnis-Kontrolle aufgetragen. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mittels des QIAquick PCR Purification Kits. Die gereinigte DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C konserviert.

2.3.4.3 Klonierung

Die Klonierung erfolgte mittels des "TOPO TA Cloning"-Kits. 4µl des PCR-Produktes wurden mit 1µl des PCR 2.1-TOPO-Vektors (3908bp) vorsichtig vermischt und 5min bei Raumtempe-

ratur inkubiert. Die kompetenten Zellen (TOP 10 F[']) wurden auf Eis aufgetaut und mit 4 µl des Ligationsansatzes gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Transformation innerhalb von 30 s bei 42 °C. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis gestellt, mit 250µl SOC Medium versetzt und 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 80µl des Ansatzes wurde auf LBamp. Platten, die 0.1g/l Ampicillin enthielten, ausgestrichen und 12 h bei 37 °C inkubiert. Mittels einer sterilen Pipette wurden 6 weiß wachsende (d.h. Plasmid mit Insert tragende) Kolonien in jeweils 5ml LB-Medium übertragen und wiederum 12h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Zur Plasmidisolierung wurde der QIAprep Miniprep Kit benutzt. Zuvor wurden 500 µl der Bakterienkultur in ein gefrierfestes Gefäß gegeben, mit 50 µl Glycerin versetzt und gemischt. Das Gefäß wurde zur Aufbewahrung des jeweiligen Klon bei -20°C eingefroren. Die verbliebene Kultur wurde 10min bei 1500g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 250µl des RNase-haltigen P1 Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch gründliches Mischen in 250µl P2 Puffer lysiert, die Suspension anschließend durch gründliches Mischen mit 350µl N3 Puffer neutralisiert und durch einen weiteren Zentrifugationsschritt unlösliche Bestandteile entfernt. Der verbliebene Überstand enthielt die gelöste Plasmid-DNA, die mittels einer Zentrifugations-Chromatographiesäule (QIAprep Spin Column) weiter gereinigt wurde. Durch aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte von je 30s in einer Minizentrifuge bei ca. 10000g wurde zuerst die Säule mit dem Überstand beladen und mittels der Puffer PB und PE die DNA gereinigt. Die Elution der gereinigten DNA erfolgte mit 50µl sterilem Wasser durch eine abschließende Zentrifugation bei 10000g für 1min. Im nächsten Schritt wurde mit 17µl der DNA-Lösung ein Plasmidverdau mit EcoR1 (+ Puffer Y⁺, TangoTM) durchgeführt, wobei an den Integrationsschnittstellen gespalten wurde, um die Größe des klonierten Produkts zu testen. Bei erfolgreicher Klonierung wurde die restliche Plasmid-Lösung mit EcoRV und Puffer B linearisiert. Die Plasmid-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und entsprechend der gewünschten Konzentration in Wasser plus 0,4µg/µl PolyA-Lösung verdünnt.

2.3.5 Quantifizierung mittels Standards

Die Vervielfältigung von Sequenzen durch PCR folgt anfangs einer exponentiellen Kinetik, die im weiteren Verlauf in eine Sättigung aufgrund der begrenzten Substratmenge sowie der Anreicherung von Endprodukten übergeht. Die Anzahl der Ausgangstranskripte im Reaktionsgefäß läßt sich anhand der PCR-Zyklen berechnen, bei denen die Kurve einen annähernd exponentiellen Charakter besitzt, d.h. am Anfangsteil der Kurven. Dieser sogenannte „Crossing point“

berechnet sich aus dem Maximum der zweiten Ableitung der aufsteigenden Kurve und wird vom der LightCycler-Software automatisch abgeschätzt. Der Kurvenverlauf bei fortgeschrittener Reaktion (Sättigung) ist vom Marker und den Sonden abhängig und für die Quantifizierung ohne Bedeutung. Für die Quantifizierung der Transkriptmenge einer cDNA-Probe wird eine Eichkurve verwendet, die die „Crossing points“ von Standard-Plasmid-Molekülen dreier verschiedener Konzentrationen gegenüber dem Logarithmus der Konzentrationen darstellt. Im quantitativen Bereich der PCR ist diese Kurve eine Gerade. Nun kann mittels des gemessenen „Crossing points“ einer cDNA Probe deren Ausgangstranskriptmenge berechnet werden. Die Quantifizierung von Transkripten einer cDNA-Probe durch eine Plasmid-Eichkurve ergibt allerdings nicht die absolute Anzahl von Ausgangstranskripten sondern eine relative Anzahl in Plasmidäquivalenten („number of standard molecules“ = NSM). Für die absolute Bestimmung müßte man einen Standard herstellen, der eine definierte Menge der gesuchten cDNA in der gleichen Umgebung wie in der Probe enthält. Sehr wahrscheinlich ist aber, daß die Ausgangstranskriptmenge proportional zu den Plasmidäquivalenten ist, so daß cDNA-Proben gleichen Hintergrundes untereinander verglichen werden können.

Zur Abschätzung der PCR Sensitivität ist es notwendig, die Anzahl der Standardmoleküle in einem Ansatz zu kennen. Das Molekulargewicht des Standards beträgt

$$M = (660 * \text{Anzahl der bp})g/mol = (660 * \text{Anzahl der bp})g / (6,023 * 10^{23} \text{ Moleküle})$$

Damit enthält 1pg

$$6,023 * 10^{11} \text{ Moleküle} / (660 * \text{Anzahl der bp})$$

Bei einer Standardkonzentration von 1pg/µl, einer Plasmidgröße von etwa 4kbp und einer Menge von 2µl befinden sich daher $1,83 * 10^9 / \text{Anzahl der bp}$, d.h. etwa 450000 Moleküle, im Ansatz.

2.3.6 Haushaltsgene

Haushaltsgene (HKG) sind für einen Zelltyp relativ konstant und stabil exprimierte Gene, deren Quantifizierung eine interne Qualitätskontrolle der Aufarbeitung ermöglicht. Unter der Annahme, daß Variationen in der Menge der HKG-Transkripte eher durch die Aufarbeitung (RNA-Isolierung, cDNA-Synthese) als durch deren biologische Variabilität bestimmt sind, lassen sich Marker-Konzentrationen durch Normierung auf die Transkriptmenge des HKGs relativieren. Wir haben PBGD gewählt, welches in gut quantifizierbarer Menge in Zellen vorhanden ist, nicht reguliert wird sowie keine Pseudogene besitzt. Als zweites HKG wurde G6PD getestet, welches ähnliche Eigenschaften wie PBGD aufweist.

2.4 Nachweis epithelialer Zellen mittels Immunzytochemie

Für immunzytochemische Untersuchungen wurden ein Teil des in ETDA-Röhrchen gesammelten Knochenmarks auf Objektträgern ausgestrichen, wobei pro Patient mindestens vier Ausstriche verarbeitet wurden. Die Objektträger wurden unfixiert bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Als Positiv-Kontrollen wurden in PBS suspendierte COLO 205 Zellen auf Objektträger gegeben und nach Trocknung ebenfalls eingefroren.

Für die Anfärbung epithelialer Zellen wurden zwei verschiedene Kits und mehrere Fixationsmöglichkeiten getestet.

Der EPIMED-Kit verwendet einen monoklonalen Pan-Zytokeratin Antikörper, der spezifisch an das Zytoskelett epithelialer Zellen bindet. Die Nachweisreaktion umfaßt eine Inkubation mit einem Detergenz zur Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran, einen Fixierungsschritt mit Formaldehyd, das Auftragen des Antikörpers A45-B/B3 (Fab-Fragment mit gebundener alkalischer Phosphatase), die Farbreaktion mit entsprechenden Substraten sowie eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die positive Färbung ergibt Zellen mit rotem Zytoplasma und blauem Zellkern.

Der „ImmunoCytoChemistry Staining“ Kit von Nexell ist insgesamt aufwendiger und verwendet ein Gemisch aus monoklonalen Zytokeratin-Antikörpern (AE1, AE3, CAM 5.2). Die Verstärkung der primären AK-Reaktion wird durch die Biotin/Avidin-Methode erreicht. Nach Fixierung der Zellen mit einer Aldehyd-haltigen Lösung folgen mehrere Inkubationsschritte zur Blockierung von endogenem Biotin sowie zur Vermeidung von unspezifischen Antikörperbindungen. Die weiteren Arbeitsschritte umfassen die Auftragung der primären Antikörpermischung, die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG ohne Fc-Fragment mit gebundenem Biotin), die Zugabe von Alkalischer Phosphatase (gekoppelt mit Streptavidin), die Farbreaktion mit entsprechenden Substraten sowie eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die positive Färbung ergibt ebenfalls Zellen mit rotem Zytoplasma und blauem Zellkern.

Jede Färbeserie enthielt Objektträger mit Patientenproben, eine Positiv-Kontrolle (COLO 205 Zellen), eine Negativkontrolle (Knochenmarkausstriche ohne epitheliale Zellen), sowie Objektträger (COLO 205-Zellen, jeweils eine Patientenprobe), die anstatt des primären Antikörpers mit einem negativen Kontroll-Reagenz (Maus-IgG) inkubiert wurden.

Für beide Kits wurden weitere Fixierungsmethoden getestet, um eine optimale Erhaltung der Zellmorphologie während der Färbung zu gewährleisten:

- Azeton für 10min
- MAF (47,5ml Methanol, 47,5ml Azeton, 5ml Formalin) für 2min.

Die methodischen Ergebnisse werden im nächsten Kapitel dargestellt.

2.5 Statistik

Alle PCR-Proben wurden doppelt analysiert und der Mittelwert aus beiden Meßwerten berechnet. Wenn eine der beiden Messungen kein positives Signal gab, wurde nur der positive Einzelwert verwendet. Dabei wurde allerdings für jeden dieser Fälle überprüft, daß der positive Wert nahe der Detektionsschwelle sowie der Wert des zur Probe gehörigen HKGs im normalen Bereich lag, um den sporadischen Charakter des Ereignisses zu unterstreichen. Zur weiteren statistischen Analyse wurde das Programm Statistica (Version 4.1) verwendet. Der verteilungsunabhängige Vergleich zweier Stichproben wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Die Berechnung der Parameter der Lognormal-Verteilungen zur Beschreibung der Markerexpression in normalen Blutproben erfolgte mit Algorithmen einer nichtlinearen Regression.