

2. Untersuchungsgut und Methodik

2.1 Verwendetes Untersuchungsgut

2.1.1 Blut

Peripher venöses Blut von 24 Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde untersucht. Als Kontrolle untersuchten wir das Blut von sieben gesunden Spendern.

Tabelle 1: Blutproben: Patienten

Patient Nr.	Patienten ID	Alter	Geschlecht	Primärtumor/ Rezidiv	letzter CEA Serumspiegel (ng/ml)	aktuell unter Chemoth.	Art der akt. Chemoth.	Ort der Metastasen [§]	Durchmesser d. Met. (cm)*	Stadium (TNM, Dukes)
1	B84	59	m		1,2	ja	Link			pT ₄ N ₁ M ₁ ; D
2	B85	74	m	p	15	ja	ART II	H	4	pT ₃ G ₃ N ₂ M ₁ ; D
3	B86	69	m	p		ja	ART II	H		[¶] pT ₃ N ₃ M ₁ ; D
4	B87	64	w	r	136	ja	THF, 5-FU	H; P		pT ₄ G ₃ N ₁ M ₁ ; D
5	B88	71	w	r	148	ja		H; A	5	pT ₃ N ₀ M ₁ ; D
6	B89	65	w	r	21	ja	Edrecolomab, I12	H	0,3	pT ₃ N ₂ M ₁ ; D
7	B90	47	w		26	ja	Alizaprid, 5-FU	H; Pe	1,5	pT ₃ G ₃ N ₁ M ₁ ; D
8	B91	73	w	r	8	ja	Irinotecan, THF, 5-FU	H	2,5	rpT ₄ G ₃ pN ₀ M ₁ ; D
9	B92	64	m	r	43	ja	Irinotecan	H	1	pT ₃ N ₁ M ₁ ; D
10	B93	55	m	p	5	ja	Cafolinat, 5-FU	H	1,5	pT ₄ G ₂ pN ₂ M ₁ ; D
11	B94	60	m	r	34	ja	Alizaprid, Cafolinat	S		[#] pT ₃ G ₃ N ₂ M ₁ ; D/ pT ₃ G ₃ N ₂ ; C
12	B95	59	w	p	>25.000	ja	THF, 5-FU	H	10	TNM ₁ ; D
13	B96	61	w			ja				TNM ₁ ; D
14	B97	65	m	p	3	ja		H		pT ₃ G ₃ N ₁ M ₁ ; D
15	B98	64	m	r	749	ja	Irinotecan	H; P	2; 3	pT ₃ N ₂ M ₁ ; D
16	B99	76	m	p	2260	ja	mayo	H	8,1	TNM ₁ ; D
17	B100	63	m			nein				
18	B101	74	m			nein				
19	B102	62	m			nein				
20	B104	60	m			nein				
21	B105	50	w			nein				
22	B106	71	m			nein				
23	B107	79	m			nein				
24	B108	85	w			nein				

H=Leberfiliae, P=Lungenfiliae, S=Dünndarmfiliae, Pe=Peritonealfiliae, A=Bauchdeckenfiliae, [§]außer Lymphknoten, *angegeben sind jeweils die größten Metastasen, [#]Rektum- und Sigmakarzinom, THF=Tetrahydrofolsäure, 5-FU=5Fluorouracil, Cafolinat=Calciumfolinat, I12=Interleukin 2, [¶]heute nur noch N₀₋₂

Das Blut wurde mittels konventioneller transkutaner Nadelpunktion bzw. über einen Port in zwei 10ml bzw. fünf 4ml Vacutainer[®]- bzw. Monovette[®]-Gefäße mit Natrium- bzw. Kalium-EDTA gesammelt. Gefäße mit EDTA wurden benutzt, weil in der Literatur darauf hingewiesen wurde, daß Heparin die PCR inhibieren könnte. Einverständnis nach Information des Patienten wurde entsprechend der Deklaration von Helsinki von allen Patienten gewonnen (World Medical Association declaration of Helsinki 1997). Die relevanten Daten der Patienten wurden in einem separaten Protokoll festgehalten. In Tabelle 1 und 2 sind alle Blutproben aufgeführt.

Tabelle 2: Blutproben: gesunde Spender

Patient Nr.	Patienten ID	Diagnose
1	Ges 1	gesund
2	Ges 2	gesund
3	Ges 3	gesund
4	Ges 86	gesund
5	Ges 9	gesund
6	Ges 10	gesund
7	FI0912	gesund

2.1.2 Gewebe

Zunächst hatte unsere Arbeitsgruppe aus 15 Proben Kolongewebe cDNA synthetisiert. Dabei stammten 9 Proben aus Operationspräparaten von Patienten mit kolorektalem Karzinom und 6 Proben aus gesundem Kolongewebe anderer Patienten (Tabelle 3). Die entstandene cDNA untersuchten wir anschließend mit unserem PCR-Protokoll auf die Expression von CEA- und Protease M-mRNA.

Tabelle 3: Kolongewebe: Patientendaten

Patient Nr.	Patienten ID	Alter	Sex	Kolongewebe	Diagnose
1	C19	79	m	normal	Kolonca, Hepatitis C
2	C10	77	m	normal	
3	C2	63	m	normal	
4	C1	57	w	normal	Kolonca
5	C7	73	m	normal	Rektumca
6	C18	64	m	normal	Kolonca
7	C40	64	w	Tumorgewebe	
8	C37	90	w	Tumorgewebe	
9	C23	73	w	Tumorgewebe	Kolonca
10	C28	63	m	Tumorgewebe	Rektumca
11	C27	61	m	Tumorgewebe	Rektumca
12	C26	80	w	Tumorgewebe	Kolonca
13	C30	71	w	Tumorgewebe	Lebermetastasen
14	C21	66	m	Tumorgewebe	Kolonca
15	C22	35	w	Tumorgewebe	Kolonca

2.1.3 Zelllinien

Für die Titrationsexperimente wurden COLO 206F Zellen (PD Carmen Scheibenbogen, Berlin, Deutschland; Eisman et al. 1987) von Gewebekulturen gewonnen, gezählt und mit Trypanblau auf Vitalität geprüft. Für die Titrationsexperimente wurde ein Aliquot von 10^6 Zellen hergestellt, der dann seriell verdünnt wurde (10^{-10^5}). Sie wurden dann auf die Expression von CEA, Protease M und Ccsg 1 hin geprüft.

Als interner Standard zur Qualitätssicherung (Willhauck et al. 1998) dienten Zellen der Linie CVNEOßGAL/E25B2 (stratagene), eines Derivats von CV 1 Afrikanischen Grünen Affenzellen.

2.2 Verwendete Methoden

2.2.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Blut und Zellen wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski et al. 1987) unter Zuhilfenahme eines kommerziell erhältlichen RNA-Extraktions Kits vorgenommen.

Während der Etablierungsphase wollten wir herausfinden, ob (1) Blutproben, die sofort nach der Blutabnahme aufgearbeitet wurden, in höheren und reineren RNA Erträgen resultieren würden, als solche, die vor der Isolierung der RNA eingefroren

wurden und (2) welcher kommerziell zu erwerbende RNA-Extraktions Kit in unseren Händen die besten RNA-Erträge im Anschluß an die Phenol-Extraktion nach Chomczynski liefern würde. Wir gewannen von sieben freiwilligen Spendern insgesamt 12 mal vier 10ml Blutproben, von denen wir zwei bei -70°C min. 2h einfroren und zwei sofort aufarbeiteten. Von den zur gleichen Zeit weiterverarbeiteten Proben wurde eine mit dem Kit der Firma Roche (Roche Diagnostics), die andere mit dem Kit der Firma Qiagen (Qiagen, Hilden Deutschland) extrahiert im Anschluß an die Aufarbeitung nach Chomczynski wie unten beschrieben. Wir prüften ebenfalls, ob die RNA Extraktion in den Händen des Doktoranden anders als in den Händen der MTA verlaufen würde. Da wir manchmal sehr niedrige RNA-Konzentrationen erhielten, benutzten wir einmal eine Vakuumzentrifuge, um die Nukleinsäure höher zu konzentrieren. Dies führten wir jedoch nicht in unser Routineprotokoll der RNA-Aufarbeitung ein, weil wir Kontaminationen befürchteten.

Mit den Proben der Patienten wurde nun wie folgt verfahren. Nach der Abnahme wurde das Blut innerhalb von zwei Stunden mit GTC-Puffer versetzt, um zu verhindern, daß die RNA z.B. durch in den Erythrozyten vorkommende RNAsen degradiert wurde. Dann wurden jeweils 10ml Vollblut in ein 50ml NUNC-Gefäß überführt, für 10min bei Raumtemperatur und 3000Upm zentrifugiert und das Plasma ab pipettiert. Daraufhin wurde 5ml Guanidiniumisothiozyanat- (GTC-) Lysepuffer zugegeben und gevortext. Die Patientenproben wurden daraufhin im Allgemeinen weiter aufgearbeitet. Einige Patientenproben wurden für max. 2h bei -70°C eingefroren und erst dann weiterverarbeitet. Vier Patientenproben wurden für ungefähr zwei Wochen bei -70°C gelagert. Gesamtleukozyten-RNA wurde dann mit der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform Prozedur in Kombination mit einem kommerziell erhältlichen RNA-Extraktions Kit (High Pure RNA Isolation Kit, Roche Diagnostics GmbH) extrahiert. Nach der Lyse der Erythrozyten wurde jeweils einer 10ml-Blutprobe pro Patient 1.000 Vektorzellen zugegeben. 6ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (125:24:1) und 500µl 2M Natrium-Azetat wurde zugefügt und kräftig gevortext, dann für min. 15min auf Eis inkubiert. Zentrifugiert wurde anschließend bei 4°C und 5.000Upm für 30min. Die wäßrige Phase wurde in ein frisches Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen eiskaltem 100%igen Isopropanol für min. 30min bei -70°C

präzipitiert. Zentrifugiert wurde wie vor der Fällung. Es folgte die Extraktion mit dem Kit. Sämtliche Lösungen wurden mit Diethyl pyrokarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser zubereitet. Die Qualität der isolierten RNA wurde auf einem 1%igen MOPS-EDTA-Natrium-Acetate (MESA) Agarose Gel ermittelt, das mit Ethidiumbromid oder SYBR Green I gefärbt wurde (1,5µl/30ml bzw. 5µl/100ml). SYBR Green I fluoresziert ähnlich wie Ethidiumbromid wenn es an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet (Morrison et al. 1998, Wittwer et al. 1997, Ririe et al. 1997). Die Quantität wurde spektrophotometrisch bestimmt. Bei der Aufarbeitung des Patientenblutes wurden für jeden Pipettierungsschritt Pipettenspitzen mit Aerosol-Filtern verwendet. Während des Umgangs mit RNA wurden stets Handschuhe getragen.

2.2.2 RNA-Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines RNA-Gels wurde in einem Erlenmeyerkolben zunächst 0,3g Agarose abgewogen und 30ml 1X MESA-Puffer (0,2M MOPS (3-N-Morpholino-Propan-Sulfonsäure) pH 7,0; 50mM Natrium-Azetat; 10mM EDTA pH 8,0) zugegeben. Die Mischung wurde in einem Mikrowellengerät erhitzt und aufgelöst. Sobald sie auf ca. 65°C abgekühlt war (handwarm) wurden 1,5µl Ethidiumbromid hinzu pipettiert. Das Gel wurde gegossen und gewartet bis es fest geworden war. In der Zwischenzeit wurden 5µl RNA mit 5µl Bromphenol-Blau Ladepuffer versetzt. Hiervon wurden 10µl/lane auf das Gel aufgetragen. 80V Spannung wurden so lange angelegt bis die Bromphenol-Blau Bande die Mitte des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend fotografiert.

2.2.3 Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde anhand ihrer Absorption in einem Spektrophotometer (Gene Quant II, Pharmacia Biotech, St Albans) gemessen. Normalerweise wurden 4µl RNA in 96µl H₂O verdünnt (1:25). Teilweise auch 5µl in 45µl (1:10), 1µl in 24µl (1:25) oder 2µl in 48µl Wasser (1:25) (alle Patientenproben). In einer Küvette wurde die Absorption bei 260nm und bei 280nm gegen den Leerwert in Wasser gemessen. Die Ratio 260nm/280nm wurde ebenfalls aufgezeichnet. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei 260nm. Ratios von 1,8 bis 2,0

weisen auf hochreine DNA- bzw. RNA-Präparationen hin. Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280nm liegt, verringern Proteinverunreinigungen die Ratio 260/280nm. Die von uns gewonnenen Ratios lagen zwar in der Regel unter 1,8, doch kann dies auch durch unzureichend gelöste RNA oder beispielsweise am pH-Wert des Verdünnungsmediums liegen, als das wir steriles Wasser benutzten, das normalerweise einen pH-Wert unter 7,0 besitzt.

2.2.4 cDNA-Synthese

In der Phase der Etablierung wollten wir herausfinden, (1) welche Menge an RNA, die wir in die cDNA-Synthese einsetzten, im niedrigsten Crossing Point resultieren würde, wenn wir eine PCR auf β 2-Mikroglobulin durchführen würden, und (2) welches von drei Protokollen zur cDNA-Synthese am besten geeignet sein würde. Das Protokoll II entspricht dem unten beschriebenen Protokoll. Protokoll I: Von jeder extrahierten RNA wurden je $x\mu\text{g}$ Gesamt-RNA und $0,4\mu\text{g}$ Random Hexamere in $8\mu\text{l}$ Wasser für die normale cDNA-Synthese und die minus-RT-Kontrolle (-RT-Kontrolle) aufgenommen. Die Bestandteile wurden gemischt, abzentrifugiert, 5min bei 65°C inkubiert und 5min auf Eis gestellt. Der RT-Mastermix pro Probe wurde zunächst erstellt aus: $5\mu\text{l}$ 5x RT-Puffer, $1,25\text{mM}$ jedes dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 40U RNase Inhibitor (Roche Diagnostics GmbH) und $9,5\mu\text{l}$ Wasser. Der Mix wurde auf und ab pipettiert und $17\mu\text{l}$ zu den -RT-Kontrollen gegeben. Dann wurde entsprechend der verbliebenen Anzahl der Proben $12,5\text{U}$ AMV Reverse Transkriptase (Roche Diagnostics) zugefügt. Zu den normalen Proben und einer Wasser-Kontrolle, die Wasser statt RNA enthielt, wurden wieder $17\mu\text{l}$ pipettiert. Die Proben wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Die cDNAs wurden dann bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Protokoll III: Von jeder extrahierten RNA wurden je $x\mu\text{g}$ Gesamt-RNA in $10\mu\text{l}$ Wasser für die normale cDNA-Synthese und die -RT-Kontrolle aufgenommen, 10min bei 65°C inkubiert, und 5min auf Eis gestellt. Der RT-Mastermix pro Probe wurde zunächst erstellt aus: $0,22\mu\text{l}$ Random Hexamere (Konzentration n.b.), $4\mu\text{l}$ 5x RT-Puffer, $0,4\mu\text{l}$ dNTPs (Konzentration n.b.), $0,63\mu\text{l}$ RNase Inhibitor (Roche Diagnostics GmbH) (Konzentration n.b.) und $4,35\mu\text{l}$ Wasser. Der Mix wurde auf und ab pipettiert und $10\mu\text{l}$

zu den -RT-Kontrollen gegeben. Dann wurde entsprechend der verbliebenen Anzahl der Proben 0,4µl AMV Reverse Transkriptase (Roche Diagnostics) (Konzentration n.b.) zugefügt. Der Mix wurde auf und ab pipettiert und 10µl zu den -RT-Kontrollen gegeben. Dann wurde entsprechend der verbliebenen Anzahl der Proben 0,4µl AMV Reverse Transkriptase (Roche Diagnostics) zugefügt. Zu den normalen Proben und einer Wasser-Kontrolle, die Wasser statt RNA enthielt, wurden wieder 10µl pipettiert. Die Proben wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Enzymdeaktivierung erfolgte für 15min bei 65°C. Die cDNAs wurden dann bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Wir setzten 1, 1,5 und 2µg RNA in jedes der drei Protokolle ein. Mit dem Protokoll II untersuchten wir dann einerseits andere Mengen an RNA und setzten andererseits statt der bis hierher verwendeten Random Hexamere, Poly-dT als Primer und statt der bisher verwendeten AMV-Reversen Transkriptase, Omniscript™ Reverse Transkriptase ein.

Mit den Proben der Patienten verfahren wir nun wie folgt: Von jeder extrahierten RNA wurden je 2µg Gesamt-RNA in 15µl Wasser für die normale cDNA-Synthese und die -RT-Kontrolle aufgenommen, für 5min bei 65°C inkubiert, um etwaige RNA-Sekundärstrukturen zu lösen, und anschließend für 5min auf Eis gestellt. Der RT-Mastermix pro Probe wurde zunächst erstellt aus: 0,1µM Oligo-dT₁₅ Primer (Qiagen), 2µl 10x RT-Puffer, 0,5mM jedes dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) und 20U RNase Inhibitor (Roche Diagnostics GmbH). Der Mix wurde auf und ab pipettiert und 7,5µl zu den -RT-Kontrollen gegeben. Dann wurde entsprechend der verbliebenen Anzahl der Proben 4U Omniscript™ Reverse Transkriptase (Qiagen) zugefügt. Zu den normalen Proben und einer Wasser-Kontrolle, die Wasser statt RNA enthielt, wurden wieder 7,5µl pipettiert. Die Proben wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Enzymdeaktivierung erfolgte für 5min bei 95°C. Die cDNAs wurden dann bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die Fähigkeit cDNA von jeder RNA-Probe zu synthetisieren wurde durch Kontrollamplifizierung von β2-Mikroglobulin- bzw. Phorphobilinogen Deaminase-mRNA ermittelt.

2.2.5 Real time on-line PCR

Um unsere PCR zu optimieren, probierten wir verschiedene Primer, Sonden, Annealing Temperaturen und $MgCl_2$ -Konzentrationen aus. Die bei den entsprechenden PCR-Läufen variierten Parameter sind in den Tabellen 4, 5 und 6 angeführt.

Tabelle 4: Etablierung der PCR auf CEA

Primer	Sonden	$MgCl_2$ -Konzentration in mmol	Annealing Temperatur in °C
CEA A	CEA 3FI	2	60
CEA B	CEA 5LC	3	65
CEA C	CEA nested primer	4	67
CEA nested primer	CEA Taqman	5	69
		6	72

Die Tabelle listet die verschiedenen Primer, Sonden, $MgCl_2$ -Konzentrationen und Annealing Temperaturen auf, die in der Etablierungsphase der PCR auf CEA ausprobiert wurden.

Tabelle 5: Etablierung der PCR auf CEA: Primer der Vorversuche

Primer	Sequenz
CEA nested Primer	5'-TCGGCATCATGATTGGAGTGCTGGT XT G
Sonden	
CEA 3FI	5'-ACACCAGGGCTGCTATATCAGAGCAACCCCA X
CEA 5LC	5'-LC Red640-CCAGCACTCCAATCATGATGCCGACAGTG ph
CEA nested Primer	5'-TCGGCATCATGATTGGAGTGCTGGT XT G

X=Fluorescein, ph=Phosphat, LC Red640=LightCycler Fluoreszenz Farbstoff 640

Die Tabelle faßt die Primer zusammen, die wir in der PCR auf CEA ausprobiert haben, die wir aber nicht in die Routine aufgenommen haben.

Tabelle 6: Etablierung der PCR auf Protease M und Ccsg1

Annealing Temperatur in °C
60
62
64
66
68

Die Tabelle faßt die verschiedenen Annealing Temperaturen zusammen, die in der Etablierungsphase der PCR auf Protease M und Ccsg1 ausprobiert wurden.

Die Annealing Temperatur beispielsweise, als derjenigen Temperatur, bei der die Fluoreszenz im LightCycler gemessen wurde, sollte idealerweise hoch genug sein, daß eine unspezifische Bindung der Sonden verhindert wird, und dabei so niedrig sein, daß eine spezifische Bindung der Sonden noch ermöglicht wird (Eckert et al. 2000). Diese Art der Spezifität wurde von uns für β 2m anhand der Schmelzkurvenanalyse, für die übrigen PCRs anhand von DNA-Gelelektrophorese überprüft. Dabei ist anzumerken, daß eine Schmelzkurvenanalyse ebenso für die letzteren PCRs möglich gewesen wäre. Eine physikalische Trennung der Amplifikate und der PCR-Amplifizierung wurde entsprechend den Empfehlungen in der Literatur durchgeführt (Kwok et al. 1989). Für die PCR wurden exklusiv Filterpipetten benutzt. Pipettiert wurde unter einer Plexiglashaube, deren Innenraum nach jedem Lauf für wenigstens 10min dem Licht einer UV-Lampe ausgesetzt wurde. Jegliche Amplifizierung, Fluoreszenzmessung und Berechnung erfolgte mit dem LightCycler (Roche Diagnostics GmbH). Bei der Auswertung der Crossing Points wurde ein Unterschied von weniger als einer Zyklusnummer als Pipettiergenauigkeit eingestuft. Alle Oligonukleotide, die bei den PCR-Läufen verwendet wurden, sind in den Tabellen 7, 8, 9 und 10 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Im Ansatz verwendete Sonden

Sonde	Sequenz
PBG-D 3FI	5'-CGTGGAATGTTACGAGCAGTGATGCCTACC X
PBG-D 5LC	5'-LC Red640-TGTGGGTCATCCTCAGGGCCATCTTC ph
Protease M 3FI	5'-CTTGCCCCAGCCCAGGATGTGCC X
Protease M 5LC	5'-LC Red640-TGGTGGTGTGGCTGAGCAGTCCCT ph
Ccsg1 3FI	5'-TATCAGAGAAGCCAGCCGATATGGATT X
Ccsg1 5LC	5'-LC Red640-CCTGCACGACCCACAGAAGAGG ph
Ve I 3FI	5'-GACCCTCCCCGCTATCTTGTATACA X
(uk,ccsg1)	
Ve I 5LC	5'-LC Red640-AGATGAAAGGATGCACTTGCCTAGC ph
(uk,ccsg1)	
CEA TaqMan	5'-6FAM-ACACCAGGGCTGCTATATCAGAGCAACCCCA YT ph
Ve II FI 2 (CEA)	5'-TGGGTGGCTGGGGCAAACGCTCTCTCCCT X
Ve II LC 2 (CEA)	5'-LC Red640-CCAAGACGGAGGAGATTTCACTTGCGGGG ph
CEA 3FI	5'-ACACCAGGGCTGCTATATCAGAGCAACCCCA X
CEA 5LC	5'-LC Red640-CCAGCACTCCAATCATGATGCCGACAGTG ph
CEA nested	5'-TCGGCATCATGATTGGAGTGCTGGT XT G
Primer	

X=Fluorescein, ph=Phosphat, LC Red640=LightCycler Fluoreszenz Farbstoff 640, 6FAM=6-carboxyfluorescein, Y=6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)

Tabelle 8: Im Ansatz verwendete Primer (single round PCR)

Primer	Sequenz	Produkt Größe (bp)
PBG-D-1 fwd	5'-TGCAGGCTACCATCCATGTCCCTGC-3'	187
PBG-D-2 rev	5'-AGCTGCCGTGCAACATCCAGGATGT-3'	
β2M-1 fwd	5'-TATCCAGCGTACTCCAAAGA-3'	165
β2M-2 rev	5'-GACAAGTCTGAATGCTCCAC-3'	

Tabelle 9: Im Ansatz verwendete Primer (Erste Runde)

Primer	Sequenz	Produkt Größe (bp)	
		Wildtyp	Vektor
Protease M fwd	5'-ACTATGATGCCGCCAGCC-3'	232	346
Protease M rev	5'-CCAGGGTAGGCATGCTCAC-3'		
Ccsg1 fwd	5'-TGTGCTCCTGGATGGTTTTAC-3'	350	441
Ccsg1 rev	5'-CATTCGTTGCTGCTCCAAG-3'		
CEA A/fwd	5'-TCTGGAAGTCTCCTGGTCTCTCAGCTGG-3'	160	334
CEA B/rev	5'-TGTAGCTGTTGCAAATGCTTTAAGGAAGAAGC-3'		

Tabelle 10: Im Ansatz verwendete Primer (Zweite Runde)

	Sequenz	Produkt Größe (bp)	
		Wildtyp	Vektor
Protease M as	5'-GGGACACCAGGTGGATGTA-3'	152	
Protease M se	5'-CCCAGCCAACTCTCTGAA-3'		
Ccsg1 as	5'-CTCCAAGTTAAAAAGTTGTTATTG-3'	265	
Ccsg1 se	5'-CCGAGCTCGAGTGTCAGTC-3'		
Protease M fwd	5'-ACTATGATGCCGCCAGCC-3'		298
ZB I rev	5'-GTTTGTAGCAGAATTGTTGCTAGT-3'		
Ccsg1 fwd	5'-TGTGCTCCTGGATGGTTTTAC-3'		319
ZB I rev	5'-GTTTGTAGCAGAATTGTTGCTAGT-3'		
CEA C	5'-GGGCCACTGTCGGCATCATGATTGG-3'	131	256
CEA B/rev	5'-TGTAGCTGTTGCAAATGCTTTAAGGAAGAAGC-3'		
CEA C	5'-GGGCCACTGTCGGCATCATGATTGG-3'		194
ZB II rev	5'-ATCAGCTCACGAACTTGGGACGG-3'		
CEA B/rev	5'-TGTAGCTGTTGCAAATGCTTTAAGGAAGAAGC-3'		n.b.
CEA nested Primer	5'-TCGGCATCATGATTGGAGTGGT XT G-3'		

β2-Mikroglobulin wurde bei den Titrationsexperimenten als Housekeeping Gen eingesetzt. Seine Primer wurden entsprechend einer veröffentlichten Sequenz erstellt (Thiounn et al. 1997). β2M-1 und β2M-2 produzieren ein Fragment von 165bp Länge. Diese Primer umspannen kein Intron. Die Sequenzen der Primer wurden von unserem Labor mit Hilfe des Programms Oligo 6 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO) erstellt. Um den Prozeß der Amplifizierung der Nukleinsäuren zu überwachen, benutzten wir SYBR Green I. Es fluoresziert wenn es an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet (Morrison et al. 1998, Wittwer et al. 1997, Ririe

et al. 1997). Die Fluoreszenz wurde während des Extensionsschrittes gemessen (Wittwer et al. 1997).

Bei den Patientenuntersuchungen wurde dagegen PBG-D als Housekeeping Gen eingesetzt. Seine Primer, PBG-D-1 forward und PBG-D-2 reverse, produzieren ein Fragment von 187bp Länge. Die Sequenzen der Primer wurden von unserem Labor mit Hilfe des Programms Oligo 6 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO) erstellt. Die Fluoreszenz wurde während des Extensionsschrittes mit Hybridisierungssonden gemessen (Wittwer et al. 1997).

Protease M wurde von uns als RNA-Tumormarker eingesetzt. Die Primer der ersten Runde, Uk 605 forward und Uk 605 reverse, amplifizieren ein Produkt von 232bp Länge. Die Sequenzen der Primer wurden von unserem Labor mit Hilfe des Programms Oligo 6 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO) erstellt. Die Primer der zweiten Runde, Uk 605 as und Uk 605 se, amplifizieren ein Produkt von 152bp Länge. Uk 605 forward und Uk 605 se binden innerhalb des Exons 5 während Uk 605 as und Uk 605 reverse innerhalb des Exons 6 des für Protease M kodierenden Gens bzw. der mRNA an (Yousef et al. 1999). Das dazwischenliegende Intron 5 umspannt wenigstens 30bp. Vektor ZB I und Uk 605 forward amplifizieren ein Produkt von 298bp Länge. Die Primersequenzen Uk 605 se, as und Vektor ZB I wurden passend zu den äußeren Primern von Herrn Olfert Landt (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) erstellt. Die Fluoreszenz wurde während des Annealing Schrittes mit Hybridisierungssonden gemessen (Kreuzer et al. 1999) und gegen die Zyklusnummer aufgetragen. Die 5'-Hybridisierungssonden wurden mit Fluorescein an ihrem 3'-Ende, 3'-Hybridisierungssonden mit LC Red640 an ihrem 5'-Ende markiert. Fluorescein wird von dem blauem Licht (470nm) aus der LightCycler LED angeregt und emittiert daraufhin grünes Licht einer etwas größeren Wellenlänge. Wenn sich die beiden Oligonukleotidsonden in enger Nachbarschaft befinden (z.B. nach Kohybridisierung der beiden Proben an die Zielsequenz), dann regt die vom Fluorescein emittierte Energie das LC Red640 an, das daraufhin rotes fluoreszierendes Licht (640nm) aussendet. Dieses Phänomen des sogenannten Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET) (Cardullo et al. 1988) erfolgt nur wenn sich beide Farbstoffmoleküle in enger Nachbarschaft befinden. Idealerweise liegt nur eine Base zwischen beiden Sonden. Um eine Extension der Sonden zu

verhindern, wurden Phosphatgruppen an den 3'-Enden der Hybridisierungssonden angebracht. Die Sequenzen der Sonden wurden von Herrn Olfert Landt (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) erstellt. Für die zweite Runde probierten wir die Annealing Temperaturen 60, 62, 64, 66 und 68°C aus.

Ccsg1 wurde von uns als zweiter RNA-Tumormarker verwendet. Die Primer der ersten Runde, Ccsg1 forward und Ccsg1 reverse, amplifizieren ein Produkt von 350bp Länge. Die Sequenzen der Primer wurden von unserem Labor mit Hilfe des Programms Oligo 6 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO) erstellt. Die Primer der zweiten Runde, Ccsg1 as und Ccsg1 se, amplifizieren ein Produkt von 265bp Länge. Vektor ZB I und Ccsg1 forward amplifizieren ein Produkt von 319bp Länge. Die Primersequenzen der zweiten Runde wurden passend zu den äußeren Primern von Herrn Olfert Landt (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) erstellt. Die Fluoreszenz wurde während des Annealing Schrittes mit Hilfe von Hybridisierungssonden gemessen (Kreuzer et al. 1999) und gegen die Zyklusnummer aufgetragen. Die Sequenzen der Sonden wurden von Herrn Olfert Landt (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland) erstellt. Für die zweite Runde probierten wir die Annealing Temperaturen 60, 62, 64, 66 und 68°C aus.

Als dritten Marker benutzten wir CEA. Die Primer der ersten Runde, CEA forward und CEA B = CEA reverse, amplifizieren ein Produkt von 160bp Länge. Die Primer der zweiten Runde, CEA C und CEA reverse, amplifizieren ein Produkt von 131bp Länge. Die Primer A, B und C wurden entsprechend veröffentlichter Sequenzen synthetisiert (Schrewe et al. 1990, Gerhard et al. 1994). Die Primer A und C binden innerhalb des Exons 9, der Primer B innerhalb des Exons 10 des für CEA kodierenden Gens bzw. der mRNA. Zwischen Exon 9 und 10 liegt das Intron 9 mit einer Länge von ca. 2,0kb (Schrewe et al. 1990). Abbildung 4 veranschaulicht die Positionen der Primer für CEA.

PCR auf CEA

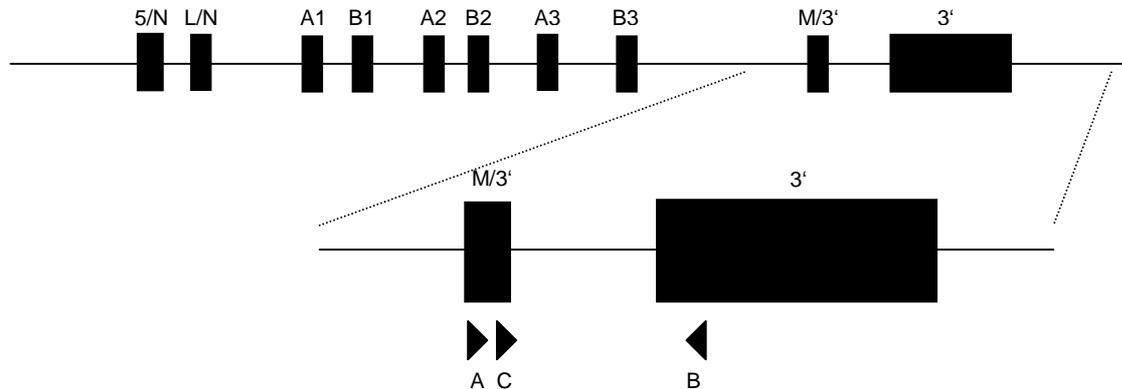


Abbildung 4: Positionen der Primer auf dem CEA-Gen

Schematischer Aufbau des menschlichen CEA Gens (Gerhard et al. 1994) und die Positionen der Primer.

Die Fluoreszenz wurde zum einen während des Annealing/Extensionsschrittes mit Hybridisierungssonden gemessen (Wittwer et al. 1997) und gegen die Zyklusnummer aufgetragen. Zum anderen dienten Hydrolysierungssonden zum Nachweis der Fluoreszenz. Dabei wurde die TaqMan Hydrolysierungssonde mit einem Geber Fluorophor am 5'-Ende (6FAM=6-carboxyfluorescein) und einem Akzeptor Fluorophor am 3'-Ende (TAMRA=6-carboxytetramethylrhodamine) doppelt markiert (Livak et al. 1995). Sie wird durch die 5'-Exonuklease Aktivität der DNA Polymerase hydrolysiert, was zu einer niedrigeren Fluoreszenzabsorption des Akzeptors führt, die während der Reaktion gemessen werden kann (Holland et al. 1991, Wittwer et al. 1997, Lie et al. 1998). Die Fluoreszenzabsorption wird dabei einerseits dadurch vermindert, daß die Sonde durch Hybridisierung ihre Beweglichkeit einbüßt, andererseits indem die Sonde zwischen Geber und Akzeptor getrennt wird (Livak et al. 1995). Außerdem prüften wir eine Kombination aus Hybridisierungssonde und Primer. Bei diesem Ansatz wurde der Primer C durch einen mit LightCycler Red markierten Primer, den wir „nested Primer“ genannt haben, ersetzt (Eckert et al. 2000). Für die Ansätze mit der kombinierten Hybridisierungssonde und der Hydrolysierungssonde überprüften wir $MgCl_2$ -Konzentrationen zwischen 2 und 6mmol. Für die Hydrolysierungssonden führten wir die zweite Runde mit verschiedenen Annealing Temperaturen, nämlich 65, 67, 69 und 72°C, aus.

Bei den Patientenproben hielten wir die folgenden PCR-Bedingungen ein: β 2-Mikroglobulin wurde mittels single round PCR (35 Zyklen) amplifiziert. Die PCR wurde durchgeführt mit 2 μ l Reaktionsmix (LightCycler-DNA Master SYBR Green I; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, beinhaltend: Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 10mM $MgCl_2$), 3mM $MgCl_2$, 0,5 μ M jedes 3' und 5' Oligonukleotidprimers (metabion GmbH, Martinsried, Deutschland), 2 μ l cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 μ l. Die PCR begann mit einem 2min Denaturierungs-Schritt bei 95°C. Die Amplifizierung erfolgte in drei Schritten pro Zyklus (Denaturierung: 95°C, 0s; Annealing: 60°C, 10s; Extension: 72°C, 15s) für 35 Zyklen. Die verwendeten Primer bildeten β 2M-1 und β 2M-2 (für β 2-Mikroglobulin). Direkt an die Amplifikation war eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen.

PBG-D wurde mittels single round PCR (35 Zyklen) amplifiziert. Die PCR wurde mit 2 μ l Reaktionsmix (LightCycler-DNA Master Hybridization Probes; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, beinhaltend: Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 10mM $MgCl_2$), 4mM $MgCl_2$, 0,2 μ M jeder 3' und 5' Fluoreszenz Hybridisierungssonde (TIB molbiol, Berlin, Deutschland), 0,5 μ M jedes 3' und 5' Oligonukleotidprimers (metabion GmbH, Martinsried, Deutschland), 2 μ l cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 μ l durchgeführt. Die PCR begann mit einem 2min Denaturierungs-Schritt bei 95°C. Die Amplifizierung erfolgte in drei Schritten pro Zyklus (Denaturierung: 95°C, 0s; Annealing: 65°C, 10s; Extension: 72°C, 15s) für 35 Zyklen. Die verwendeten Primer waren PBG-D-1 forward und PBG-D-2 reverse (PBG-D). Die verwendeten Sonden beinhalteten: PBG-D 5LC und PBG-D 3FI.

Protease M und Ccsg 1 wurden mittels Nested PCR amplifiziert (erste Runde 25-35, zweite Runde 45 Zyklen). Die erste Runde PCR wurde mit 2 μ l Reaktionsmix (LightCycler-DNA Master Hybridization Probes; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, enthaltend: Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 10mM $MgCl_2$), 4mM $MgCl_2$, 0,5 μ M jedes 3' und 5' Oligonukleotidprimers (metabion GmbH, Martinsried, Deutschland), 2 μ l cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 μ l durchgeführt. Die PCR begann mit einem

2min Denaturierungs-Schritt bei 95°C. Die Amplifizierung erfolgte in drei Schritten pro Zyklus (Denaturierung: 95°C, 0s; Annealing: 70°C, 10s; Extension: 72°C, 15s) für 25-35 Zyklen. Die verwendeten Primer beinhalteten: uk 605 forward, uk 605 reverse (Protease M); ccsg1 forward, ccsg1 reverse (Ccsg1). Wenn die erste Runde PCR beendet war, wurden die LightCycler Kapillaren kopfüber in ein steriles 1,5ml Eppendorfgefäß gesetzt und kurz bei 1.500Upm in einer Amplifikat-freien Umgebung zentrifugiert. Die Proben wurden daraufhin entweder sofort für die zweite Runde PCR benutzt oder bei -20°C in einem separaten Kühlschrank, der ausschließlich zur Lagerung von Amplifikaten bestimmt war, gelagert. Die zweite Runde Nested PCR für Protease M, Ccsg 1 und Vektor (Protease M, Ccsg 1) wurde mit 2µl Reaktionsmix (LightCycler-DNA Master Hybridization Probes; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, beinhaltend: Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 10mM MgCl₂), 4mM MgCl₂, 0,2µM jeder 3' und 5' Fluoreszenz Hybridisierungssonde (TIB molbiol, Berlin, Deutschland), 0,5µM jedes 3' und 5' Oligonukleotidprimers (metabion GmbH, Martinsried, Deutschland), 2µl cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von 20µl durchgeführt. Die PCR begann mit einem 2min Denaturierungs-Schritt bei 95°C. Die Amplifizierung erfolgte in drei Schritten pro Zyklus (Denaturierung: 95°C, 0s; Annealing: 60°C, 10s; Extension: 72°C, 15s) für 45 Zyklen. Die verwendeten Primer beinhalteten: uk 605 antisense, uk 605 sense (Protease M); ccsg1 antisense, ccsg1 sense (ccsg1); uk 605 forward, ZB I rev (Vektor). Die verwendeten Sonden waren: Uk 3FI, Uk 5LC (Protease M); Ccsg1 3FI, Ccsg1 5LC (Ccsg 1); Ve 3FI, Ve 5LC (Protease M, Ccsg 1).

CEA wurde mittels Nested PCR amplifiziert (erste Runde 25-35, zweite Runde 45 Zyklen). Die erste Runde PCR wurde mit 2µl Reaktionsmix (LightCycler-DNA Master Hybridization Probes; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, enthaltend: Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 10mM MgCl₂), 4mM MgCl₂, 0,5µM jedes 3' und 5' Oligonukleotidprimers (metabion GmbH, Martinsried, Deutschland), 2µl cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von 20µl durchgeführt. Die PCR begann mit einem 2min Denaturierungs-Schritt bei 95°C. Die Amplifizierung erfolgte in drei Schritten pro Zyklus (Denaturierung: 95°C, 0s; Annealing: 70°C, 10s; Extension: 72°C, 15s) für 25-35 Zyklen. Die verwendeten

Primer beinhalteten: CEA forward und CEA B/reverse (CEA). Wenn die erste Runde PCR beendet war, wurden die LightCycler Kapillaren kopfüber in ein steriles 1,5ml Eppendorfgefäß gesetzt und kurz bei 1.500Upm in einer Amplifikat-freien Umgebung zentrifugiert. Die Proben wurden daraufhin entweder sofort für die zweite Runde PCR benutzt oder bei -20°C in einem separaten Kühlschrank, der ausschließlich zur Lagerung von Amplifikaten bestimmt, war gelagert. Die zweite Runde Nested PCR auf CEA im TaqMan Format wurde mit $2\mu\text{l}$ Reaktionsmix (LightCycler-DNA Master Hybridization Probes; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, beinhaltend: Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 10mM MgCl_2), 3mM MgCl_2 , $0,2\mu\text{M}$ der CEA TaqMan Probe (TIB molbiol, Berlin, Deutschland), $0,5\mu\text{M}$ jedes 3' und 5' Oligonukleotidprimers (metabion GmbH, Martinsried, Deutschland), $2\mu\text{l}$ cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von $20\mu\text{l}$ durchgeführt. Die PCR begann mit einem 2min Denaturierungs-Schritt bei 95°C . Die Amplifizierung erfolgte in zwei Schritten pro Zyklus (Denaturierung: 95°C , 0s; Annealing und Extension: 65°C , 30s) für 45 Zyklen. Die verwendeten Primer beinhalteten: CEA C, CEA B/reverse (CEA). Die zweite Runde Nested PCR für Vektor (CEA) wurde mit $2\mu\text{l}$ Reaktionsmix (LightCycler-DNA Master Hybridization Probes; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, beinhaltend: Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 10mM MgCl_2), 3mM MgCl_2 , $0,2\mu\text{M}$ jeder 3' und 5' Fluoreszenz Hybridisierungssonde (TIB molbiol, Berlin, Deutschland), $0,5\mu\text{M}$ jedes 3' und 5' Oligonukleotidprimers (metabion GmbH, Martinsried, Deutschland), $2\mu\text{l}$ cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von $20\mu\text{l}$ durchgeführt. Die PCR begann mit einem 2min Denaturierungs-Schritt bei 95°C . Die Amplifizierung erfolgte in drei Schritten pro Zyklus (Denaturierung: 95°C , 0s; Annealing: 60°C , 10s; Extension: 72°C , 15s) für 45 Zyklen. Die verwendeten Primer beinhalteten: CEA C, ZB2 rev * (Vektor). Die verwendeten Sonden beinhalteten: Ve FI 2, Ve LC 2 (CEA).

2.2.6 Analyse der Schmelzkurve

Für alle PCR Läufe auf $\beta 2\text{m}$ wurde im LightCycler eine Schmelzkurve ermittelt (Ririe et al. 1997). Wird die Temperatur langsam angehoben, während die Fluoreszenz

kontinuierlich überwacht wird, so nimmt die Fluoreszenz schlagartig ab, sobald die Denaturierungstemperatur erreicht wird, und SYBR Green I dissoziiert. Unspezifische Produkte, mit einem Schmelzpunkt bzw. einem Fluoreszenzabfall bei niedrigeren Temperaturen, können so nachgewiesen werden.

2.2.7 Standards

Die absolute Quantifizierung eines potentiellen Markers ist nur möglich, wenn die absoluten Mengen des jeweiligen Transkriptes bekannt sind. Hierzu wurden die künstlichen und natürlichen Targets von CEA und Protease M aus 206F Zellen mRNA zunächst amplifiziert, und dann in einer DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Amplifikate wurden unter dem Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten und gereinigt. Dann wurden sie in einen topo Vektor (Invitrogen) inkloniert. Die Bakterien mit dem Vektor wurden vermehrt und eine Minipräparation durchgeführt. Dann wurden die Plasmide für jede Titerstufe doppelt seriell verdünnt: von 1,5pg zehnfache Verdünnungen bis 1,5ag. Diese Verdünnungen wurden einmalig im LightCycler amplifiziert. Dabei wurden die Crossing Points gegen den log der Konzentration aufgetragen, und ergaben auf diese Weise Standardkurven aller Transkripte. Hätten wir Proben unbekannter Konzentration mitlaufen lassen, dann hätte deren Konzentration (N) automatisch mittels Referenz zu dieser Kurve ausgerechnet werden können, entsprechend der Formel: $N = Ct - b/m$, wobei Ct den Crossing Point der jeweiligen Probe, b den Ordinatenschnittpunkt und m die Steigung der Standardkurve des amplifizierten Transkripts angibt (Bustin et al. 1999).

2.2.8 DNA-Gelelektrophorese

Um die Spezifität einiger Amplifikate beurteilen zu können, wurden diese gelelektrophoretisch auf 1,5%igen SYBR Green I oder Ethidiumbromid Agarose Gelen aufgetrennt. Dazu wurde 1,5g Agarose in 100ml 1X TBE-Puffer (0,09M Tris-Puffer, 0,09M Borsäure, 0,001M EDTA) in der Mikrowelle gekocht. Nachdem sie auf Handwärme abgekühlt war, wurden 5µl Ethidiumbromid hinzugefügt, und das Gel gegossen. In der Zwischenzeit wurden in sterile Eppendorfgefäße entsprechend der Anzahl der Amplifikatproben 5µl Bromphenol-Blau Ladepuffer gegeben und die

Glasröhrchen, in denen die Amplifizierung stattgefunden hatte, kopfüber in die Eppendorfgefäße gestellt. Diese Gefäße wurden nun in einem separaten Labor kurz bei 1500Upm zentrifugiert. Die Röhrchen wurden verworfen und die Eppendorfgefäße wieder verschlossen. War nun das Gel hart geworden, so wurde es mit 1X TBE-Puffer überschichtet, der Kamm entfernt und 10µl DNA-Ladepuffer-Gemisch in die Schlitze pipettiert. Eine Spannung von 80-100V wurde solange angelegt, bis die Bromphenol-Blau Bande die Mitte des Gels erreicht hatte. Die DNA wurde im Transilluminator begutachtet, ein Foto geschossen und die Größe der Amplifikate anhand eines mitgelaufenen Markers (meist 100-1500bp) beurteilt. Die Stärke der Bande der Amplifikate wurde mit sehr schwach (x), schwach (xx) oder sehr deutlich (xxx) ohne Wissen der entsprechenden Crossing Points evaluiert.

2.2.9 Qualitätskontrolle

Ein großes Repertoire an Positiv- und Negativkontrollen sicherte den Nachweis systematischer und sporadischer Kontaminationen und belegte etwaige Unterschiede in der Sensitivität (Keilholz et al. 1997, Watzinger et Lion 1998) (siehe Abbildung 1).

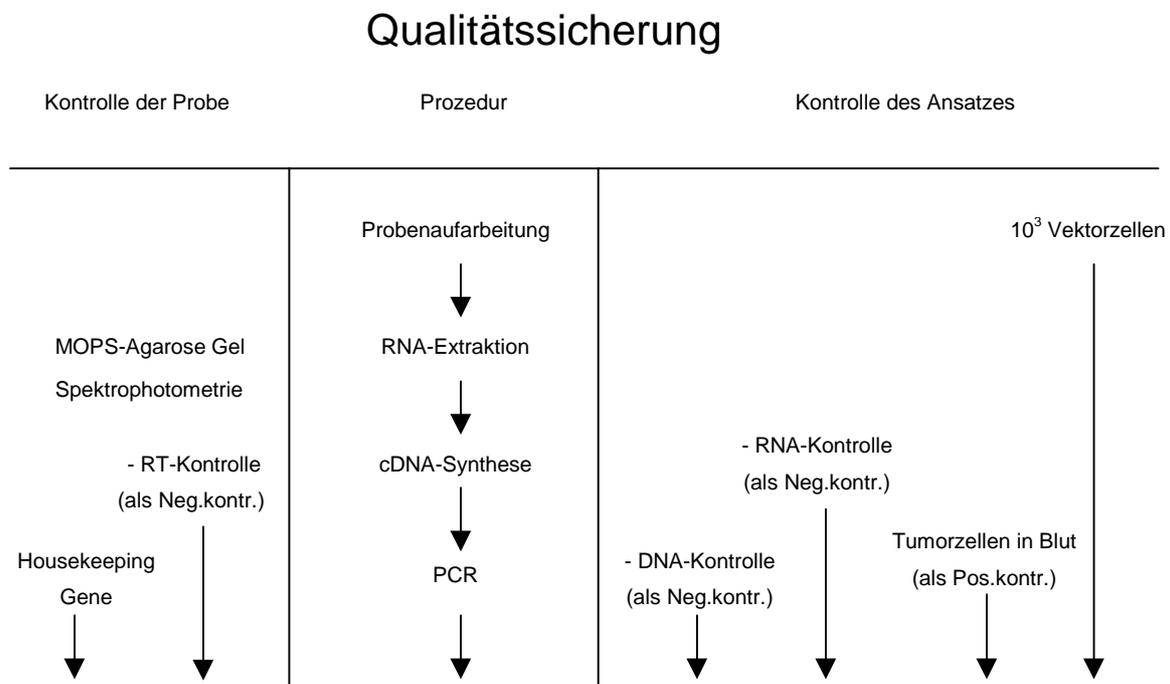


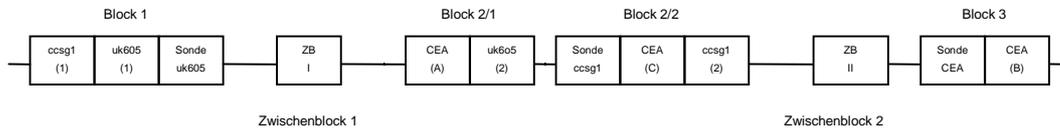
Abbildung 1: Qualitätssicherung

Die Abbildung stellt die verschiedenen Kontrollen, die wir im Ansatz verwendet haben, dar.

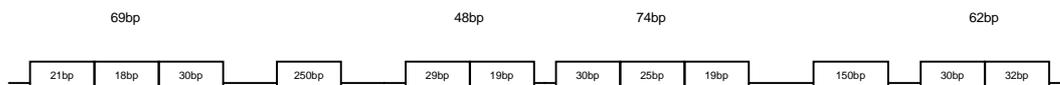
Da grundsätzlich Kontaminationen und geringe Sensitivität von jedem Schritt des Prozesses ausgehen können (Isolierung der RNA, cDNA-Synthese, PCR), müssen entsprechend viele Kontrollen verwandt werden. Kontrolle der Proben: Ob sich eine RNA für die Analyse eignete, wurde anhand der Gelelektrophorese und der Spektrophotometrie beurteilt. Jede cDNA Synthese einer RNA erfolgte mit und ohne Reverse Transkriptase, um systematische und sporadische Kontaminationen bei dem Umgang mit den Proben und der Isolierung der RNA auszuschließen. Ein positives PCR Signal der -RT-Kontrolle hätte eine Kontamination angezeigt (siehe hierzu auch Diskussion). Das Produkt der cDNA-Synthese mit RT wurde auf die Amplifizierung eines Housekeeping Gens geprüft. Kontrolle des Ansatzes: Um die Effizienz der Probenaufarbeitung zu überwachen, wurde ein interner Standard mit den gleichen primer sites wie die des natürlichen Targets amplifiziert. Für die cDNA-Synthese wurde jedem Ansatz mehrerer Proben eine Wasserkontrolle (-RNA-Kontrolle) beigefügt, um Kontaminationen der Reagenzien auszuschließen. Ebenso wurde in bezug auf die PCR verfahren (-DNA-Kontrolle). Jeder Lauf enthielt auch eine Positivkontrolle für die RNA, die von einer Gesundblutprobe stammte, die mit Tumorzellen beimpft worden war, um die Effizienz der PCR zu ermitteln. Die erwähnte Kontrolle durch den internen Standard (Willhauck et al. 1998, Freeman et al. 1999) benutzten wir u.a. um die Kontrolle durch das Housekeeping Gen zu ersetzen, denn seine Transkription könnte sich nicht nur unter normalen Bedingungen (Finnegan et al. 1990, Gong et al. 1996), sondern insbesondere auch unter einer Chemotherapie oder einem neoplastischen Prozeß signifikant ändern (Nicolson 1991, Schek et al. 1988, Cox et al. 1991). Hierzu dienten Zellen der Linie CVNEOßGAL/E25B2 (stratagene), eines Derivats von CV 1 Afrikanischen Grünen Affenzellen. Diese Zellen enthielten den Vektor poG45, in den eine künstliche Sequenz (siehe Abbildung 2) inkloniert worden war (O'Gorman et al. 1991, Broach et al. 1980, Veres et al. 1987), die als Kontrollgen benutzt wurde.

Interner Standard (Vektor)

Schematischer Aufbau



Länge in Basenpaaren



Schnittstellen



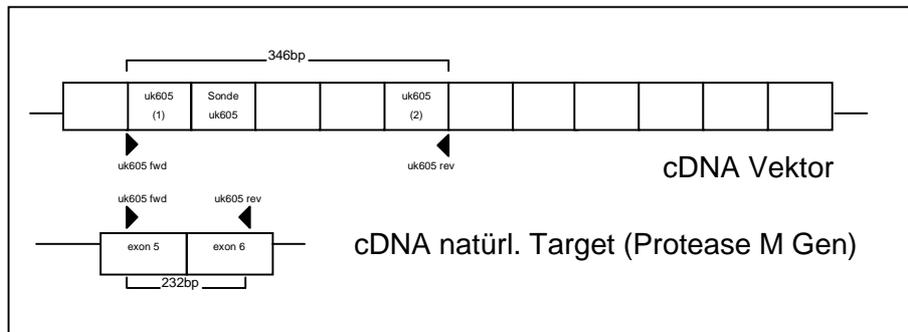
Abbildung 2: Interner Standard (Vektor)

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des internen Standards, den wir verwendet haben (Dr. Nicole Max, Berlin).

Diese Sequenz stammte von Dr. Nicole Max, Berlin. Die Patientenproben wurden vor der Separation des Blutes, Isolierung der RNA und RT-PCR mit 10^3 Kontrollzellen beimpft. Die Idee des internen Standards, wie wir ihn benutzen, ist folgende: Nach der Isolierung der RNA der Blutproben liegt sowohl die mRNA der Tumorzellen, als auch die mRNA der Vektorzellen vor. Beide werden in cDNA umgeschrieben. In der ersten Runde der PCR binden die Primer sowohl an das natürliche Target, als auch an die Bindungsstellen im Vektor (siehe Abbildung 3). Es entstehen Amplifikate unterschiedlicher Länge, die in der Tabelle 10 abzulesen sind.

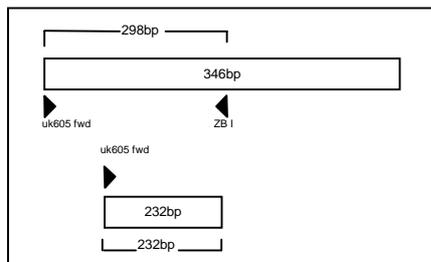
Nested PCR auf Protease M

1. Runde



2. Runde

PCR auf Vektor



PCR auf natürl. Target

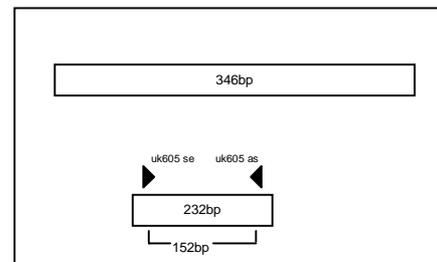


Abbildung 3: Nested PCR auf Protease M

Die Abbildung veranschaulicht die Amplifikation des natürlichen und künstlichen Targets von Protease M während der Nested PCR. Nach der Isolierung der RNA der Blutproben liegt sowohl die mRNA der Tumorzellen, als auch die mRNA der Vektorzellen vor. Beide werden in cDNA umgeschrieben. In der ersten Runde der PCR binden die Primer sowohl an das natürliche Target, als auch an die Bindungsstellen im Vektor. Es entstehen Amplifikate unterschiedlicher Länge.

Anzumerken wäre noch, daß selbst wenn alle Kontrollen negativ wären, z.B. Kreuzkontaminationen nicht ausgeschlossen werden können.

2.2.10 Titrationsexperimente

Um die in vitro Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Quantifizierbarkeit unseres Ansatzes zu ermitteln, und um ihn auf mögliche Kompetitionen zwischen natürlichem (Primer site der Tumorzell-cDNA) und künstlichem Target (Primer site der Vektorzell-cDNA) hin zu untersuchen, führten wir Titrationsexperimente durch (siehe nachfolgende Aufzählung):

1. Blutproben von gesunden Spendern wurden mit seriell verdünnten Tumorzellen beimpft
2. Tumorzellen wurden seriell in Wasser verdünnt
3. die in 1. gewonnene cDNA von Proben mit 10^5 Tumorzellen und von Proben mit 10^3 Vektorzellen wurde seriell in Wasser bzw. in cDNA von unbeimpftem Gesundblut verdünnt.

Dann wurde die RNA wie oben beschrieben extrahiert. Anschließend wurde die PCR auf Protease M-, Ccsg1-, CEA-mRNA, sowie ihre künstlichen Targets und auf $\beta 2m$ durchgeführt.

Ad 1. : Die kolorektale Tumorzelllinie COLO 206F und die Kontrollzelllinie CVNEO β GAL/E25B2 (stratagene) wurden zum Beimpfen von Gesundblutproben benutzt. Wir führten eine Serie von insgesamt neun Titrationsexperimenten á fünf Blutproben mit beimpftem Gesundblut durch. Die RT-PCR Analyse wurde mit 10ml Blut, das mit von 10 bis 10^5 seriell verdünnten 206F Zellen und 0, 10^2 , 10^3 , 10^4 oder 10^6 Kontrollzellen beimpft wurde, durchgeführt. Single round PCR wurde auf $\beta 2$ -Mikroglobulin, Nested PCR auf CEA (1.Runde 30Zyklen), Protease M (1.Runde 25, 30, 35 Zyklen), Ccsg1 (1.Runde 35 Zyklen) und künstliches Target durchgeführt. Ausgewählte PCR-Läufe wurden elektrophoretisch untersucht.

Ad 2. : Um die Funktion unserer Titrationsexperimente auf Ebene der cDNA zu prüfen, führten wir Titrierungen auch mit 206F Zellen (ungezählt) in GTC-Puffer, die wir in Wasser verdünnten, durch: 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10.000. Die fünf Verdünnungen gaben wir auf Extraktionssäulen der Firma Qiagen und führten die Extraktion nach Anleitung durch. Wir führten PCRs auf CEA (1. Runde 20 und 30 Zyklen), Protease M (1. Runde 20 Zyklen), Ccsg1 (1. Runde 20 und 30 Zyklen) und $\beta 2m$ durch. Ausgewählte PCR-Läufe wurden elektrophoretisch untersucht.

Ad 3. : Um die Funktion unserer Titrationsexperimente mit beimpftem Gesundblut zu prüfen, führten wir auch insgesamt sechs Titrierungen á fünf Verdünnungsstufen mit cDNA durch. Die cDNA von 10^5 206F Zellen wurde zunächst seriell verdünnt: $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^3$, $8 \cdot 10^2$, $16 \cdot 10$, bzw. 10 bis 10^5 . Wir verdünnten die cDNA zunächst mit Gesundblut cDNA ohne zugegebene Zellen, später auch mit Wasser.

Nested PCRs wurden ausgeführt für alle drei Marker: CEA (1. Runde 20 Zyklen), Protease M (1. Runde 20, 25 und 30 Zyklen) und Ccsg1 (1. Runde 20 Zyklen). Single round PCRs wurden auf CEA (40 Zyklen, inneres Primerpaar, äußeres Primerpaar), Protease M (45 Zyklen, inneres Primerpaar, äußeres Primerpaar) und Ccsg1 (45 Zyklen, inneres Primerpaar, äußeres Primerpaar) durchgeführt.

Ein Lauf wäre dann quantitativ gewesen, wenn sich der Crossing Point pro Verdünnungsstufe (1:10) um drei Zyklen verändert hätte.

2.3 Statistische Methoden

Die Crossing Points der natürlichen Targets von Protease M und CEA bei den Patientenblutproben wurden als kontinuierliche Variablen mit nicht-parametrischer Verteilung anhand des Spearman-Tests mit Hilfe des Programmes Statview verglichen.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Methoden der Isolierung von RNA, die cDNA-Synthese und Teile der PCR zunächst in Vorversuchen optimiert. Die Experimente wurden mehrfach wiederholt, um ihre Reproduzierbarkeit zu belegen. Nachdem die Methoden etabliert worden waren, wurden sie auf das Untersuchungsgut angewendet. Im folgenden möchte ich deshalb einige Ergebnisse aus den Vorversuchen beschreiben.

3.1 Ergebnisse der Etablierungsphase

3.1.1 Isolierung von RNA

Wir konnten zeigen, daß Blutproben, die unmittelbar nach der Blutabnahme aufgearbeitet wurden, zu besseren RNA Erträgen führten als die Gefrorenen. Wir erzielten mit dem Kit der Firma Roche Diagnostics GmbH bessere Ergebnisse, als mit demjenigen der Firma Qiagen. Obwohl die Ratios der RNAs mit dem Qiagen-Kit besser waren, lieferte dieser die schlechteren Erträge. Unsere Ergebnisse sind in den Tabellen 11, 12, 13 und 14 sowie dem Foto 1 zusammengefaßt. Die Isolierung