

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

von RNA lieferte in den Händen des Doktoranden und der MTA vergleichbare Ergebnisse. Nach der Isopropanolfällung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  beobachteten wir in seltenen Fällen eine ca. 3mm dicke Interphase.

**Tabelle 11: RNA Ertrag des Roche Kits**

Nr.	Blutprobe	Konzentration ( $\mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$ Verdünnungspuffer)	
		frische Proben	gefrorene Proben
1	Ke0810	0,4	0,1
2	Ka3009	0,9	
3	Li3009/1110		0,2
4	Be0410	0,6	0,5
5	Se0510	0,5	0,3
6	FI0610	0,4	0,3
7	FI0810	0,4	0,5
8	FI1110	0,8	0,5
9	Se1110	0,7	0,2
10	FI1510	0,5	0,8
11	Ni1810	0,4	0,2
12	Li1810	0,6	0,2
	Durchschnitt	0,5	0,3

**Tabelle 12: RNA Ratios des Roche Kits**

Nr.	Blutprobe	Ratio (260/280)	
		frische Proben	gefrorene Proben
1	Ke0810	1,6	1,8
2	Ka3009	1,6	
3	Li3009/1110		1,6
4	Be0410	1,6	1,7
5	Se0510	1,7	1,7
6	FI0610	1,7	1,8
7	FI0810	1,6	1,6
8	FI1110	1,6	1,6
9	Se1110	1,7	2
10	FI1510	1,6	1,5
11	Ni1810	1,9	1,5
12	Li1810	1,8	1,8
	Durchschnitt	1,7	1,7

*Die Tabellen 11 und 12 zeigen die Resultate der RNA-Extraktionen mit dem Roche Kit.*

**Tabelle 13: RNA Ertrag des Qiagen Kits**

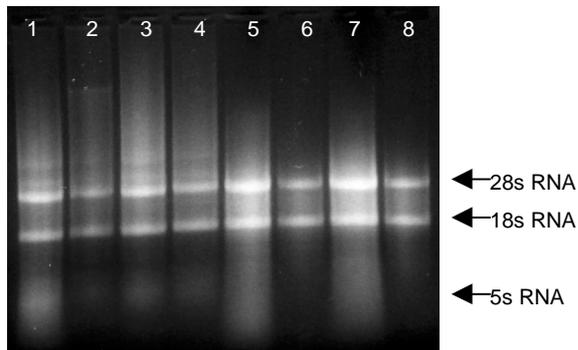
Nr.	Blutprobe	Konzentration ( $\mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$ Verdünnungspuffer)	
		frische Proben	gefrorene Proben
1	Ke0810	0,2	0,2
2	Ka3009	0,7	
3	Li3009/1110		0,1
4	Be0410	0,3	0,5
5	Se0510	0,3	0,1
6	FI0610	0,7	0,2
7	FI0810	0,3	0,03
8	FI1110	0,4	0,3
9	Se1110	0,2	0,1
10	FI1510	0,3	0,1
11	Ni1810	0,4	0,2
12	Li1810	0,4	0,2
	Durchschnitt	0,4	0,2

**Tabelle 14: RNA Ratios des Qiagen Kits**

Nr.	Blutprobe	Ratio (260/280)	
		frische Proben	gefrorene Proben
1	Ke0810	1,8	1,8
2	Ka3009	1,7	
3	Li3009/1110		1,9
4	Be0410	1,8	1,7
5	Se0510	1,8	1,9
6	FI0610	1,8	2
7	FI0810	1,8	2,2
8	FI1110	1,8	1,8
9	Se1110	2	2,2
10	FI1510	1,7	1,8
11	Ni1810	1,8	1,8
12	Li1810	1,9	2,1
	Durchschnitt	1,8	1,9

Die Tabellen 13 und 14 zeigen die Resultate der RNA-Extraktionen mit dem Qiagen Kit.

### Foto 1: RNA-Extraktion



Spur	Inhalt
1	Spender A, frisch, Q-Protokoll
2	Spender A, gefroren., Q-P.
3	Spender B, fr., R-P.
4	Spender B, gefr., R-P.
5	Spender A, fr., Q-P.
6	Spender A, gefr., Q-P.
7	Spender B, fr., R-P.
8	Spender B, gefr., R-P.

Das Foto zeigt RNA-Extraktionen aus den Vorversuchen. Q=Qiagen, R=Roche

### 3.1.2 cDNA-Synthese

Das Protokoll II zur cDNA-Synthese ergab für RNA-Mengen von 1,0, 1,5 und 2,0 $\mu$ g die niedrigsten Crossing Points und damit die besten Ergebnisse. Dieses Protokoll wählten wir deshalb zur Patientenuntersuchung aus. Als wir in zusätzlichen Versuchen die Menge an RNA noch weiter anhoben, verringerte sich der Crossing Point noch weiter und es schien als erreiche er bei 4,5 $\mu$ g ein Minimum. Wir entschlossen uns 2 $\mu$ g RNA in die cDNA-Synthese einzusetzen, um sicher gehen zu können, daß auch geringe Erträge an RNA es uns ermöglichen würden, eine cDNA-Synthese mit einem Anfangsvolumen von 15 $\mu$ l durchzuführen. Die Ergebnisse der Vorversuche der cDNA-Synthese zeigen die Tabellen 15, 16 und 17.

Die Tabellen 15a,b, 16 und 17 zeigen die Resultate der Vorversuche bezüglich der cDNA-Synthese. Protokoll II zeigte die besten Ergebnisse. Während in den Versuchen 1 bis 5 noch die AMV Reverse Transkriptase verwendet wurde, benutzten wir später die Omniscript Reverse Transkriptase.

**Tabelle 15a: cDNA-Protokoll II**

Crossing Points (PCR auf $\beta$ 2-Mikroglobulin)						
RNA-Menge	1	2	3	4	5	Durchschnitt
1	14,14	14,04	19,23	14,89	14,38	15,34
1,5	13,72	13,77	18,82	14,58	13,85	14,95
2	13,68	13,37	13,04	14,46	13,85	13,68

**Tabelle 16: cDNA-Protokoll I**

Crossing Points (PCR auf $\beta$ 2-Mikroglobulin)						
RNA-Menge	1	2	3	4	5	Durchschnitt
1	18,01	18,02	14,63	17,45	16,93	17,01
1,5	17,59	15	14,76	17,01	16,66	16,20
2	15,81	17,76	14,57	16,61	16,15	16,18

**Tabelle 17: cDNA-Protokoll III**

Crossing Points (PCR auf $\beta$ 2-Mikroglobulin)						
RNA-Menge	1	2	3	4	5	Durchschnitt
1	15,89	15,51	15,78	17,7	17,38	16,45
1,5	15,55	15,1	15,11	14,93	14,45	15,02
2		14,78		17,5	17,41	16,56

**Tabelle 15b: cDNA-Protokoll II**

Crossing Points (PCR auf $\beta$ 2-Mikroglobulin)											
RNA-Menge	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16	Durchschnitt
1											
1,5								11,48	12,12	11,92	11,84
2	12,69	12,1	11,75	11,64	11,65	12,54	11,87	11,39	11,69	11,74	11,91
2,5	12,44					12,43	11,71	11,75	11,55	11,45	11,89
3	11,99					11,96	11,68	11,45	11,46	11,17	11,62
3,5	11,87					12,01	11,43	10,78	11,1	11,44	11,44
4	11,96					11,8	11,09	10,67	10,94	11,12	11,26
4,5	11,42					11,47	11,02	10,7	10,87	11,05	11,09
5	11,61					12,19	10,78	10,62			11,3
5,5	10,91	10,48	9,95	11,78	11,99	12,96					11,35
6	11,13	10,48	19,49	19,99	20,2	12,57					15,64
6,5		10,49	11,43	11,87	11,83	12,63					11,65
7				17,06	17,21						17,14
7,5				11,81	11,8						11,81
8				20,58	20,63						20,61
8,5				16,8	16,98						16,89

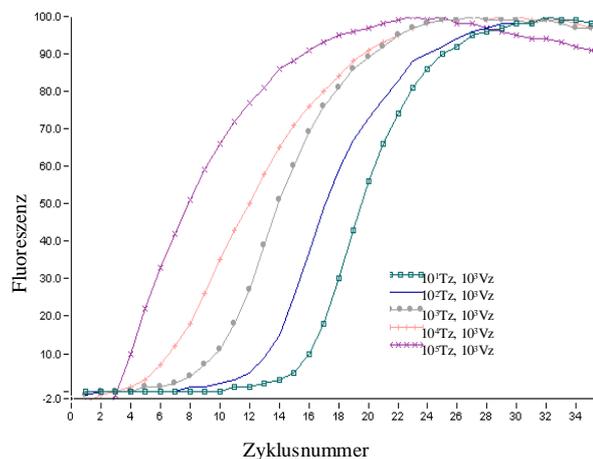
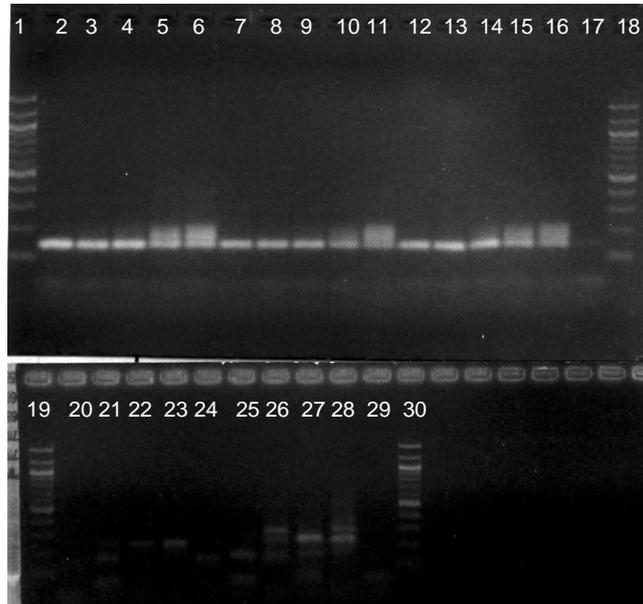
### 3.1.3 Titrationsexperimente

Bei den Titrationsexperimenten hatten wir zunächst Blutproben von gesunden Spendern mit seriell verdünnten Tumorzellen beimpft (siehe 1. Titrationsexperiment). Dabei gelang es uns, wenn auch das Gros der Läufe nicht quantitativ war, einige quantitative Läufe zu gewinnen. Es ließ sich ein Limit der Detektion von 10 Zellen für Protease M-mRNA,  $10^5$  Zellen für Ccsg 1 und  $10^3$  Zellen für CEA (keine Vektorzellen) vermuten. Wurden  $10^4$  Kontrollzellen benutzt, lag die Grenze immer noch bei 10 Zellen für Protease M und  $10^5$  Zellen für Ccsg1. Dies deutete auf eine Nachweisgrenze von einer Tumorzelle in ungefähr  $10^6$  Leukozyten hin. Aussagen über eine mögliche Konkurrenz zwischen Vektorzellen und natürlichem Target um die Bindung der Primer möchten wir aufgrund unserer in dieser Hinsicht sehr lückenhaften Ergebnisse nur vorsichtig äußern. Eine Konkurrenz derart, daß die Crossing Points für das natürliche Target gleichmäßig größer wurden, je mehr Vektorzellen zugegeben wurden, war nicht gegeben. Je mehr Vektorzellen eingesetzt wurden, desto früher lag der Crossing Point für das künstliche Target. Das Vektorsignal für die drei Marker schwankte innerhalb der gleichen Probe. Einen Überblick der beschriebenen Titrationsexperimente und die maximale Sensitivität der PCR-Läufe liefert Tabelle 18. In der Synopsis 1 läßt sich an einem Beispiel Gelelektrophorese mit Real-time PCR vergleichen.

## Synopsis 1: Titrationsexperimente: COLO 206F Zellen in Blut

Das Foto zeigt die DNA-Gelelektrophorese eines Titrationsexperimentes mit Tumorzellen in Gesundblut. Die PCR lief mit 25 Zyklen in der ersten und 45 Zyklen in der zweiten Runde auf Protease M, bzw. das künstliche Target von Protease M.

Spur	Inhalt	Crossing Point
2	Tz $10^1$ :Pm	16,05
3	Tz $10^2$ :Pm	11,6
4	Tz $10^3$ :Pm	9,92
5	Tz $10^4$ :Pm	
6	Tz $10^5$ :Pm	
7	Vz $10^3$ Tz $10^1$ :Pm	16,02
8	Vz $10^3$ Tz $10^2$ :Pm	13,25
9	Vz $10^3$ Tz $10^3$ :Pm	10,15
10	Vz $10^3$ Tz $10^4$ :Pm	6,43
11	Vz $10^3$ Tz $10^5$ :Pm	
12	Vz $10^4$ Tz $10^1$ :Pm	15,74
13	Vz $10^4$ Tz $10^2$ :Pm	13,88
14	Vz $10^4$ Tz $10^3$ :Pm	9,3
15	Vz $10^4$ Tz $10^4$ :Pm	5,07
16	Vz $10^4$ Tz $10^5$ :Pm	
17	1.R Wasser	
20	Vz $10^3$ Tz $10^1$ :ve	
21	Vz $10^3$ Tz $10^2$ :ve	
22	Vz $10^3$ Tz $10^3$ :ve	14,89
23	Vz $10^3$ Tz $10^4$ :ve	
24	Vz $10^3$ Tz $10^5$ :ve	
25	Vz $10^4$ Tz $10^1$ :ve	29,42
26	Vz $10^4$ Tz $10^2$ :ve	
27	Vz $10^4$ Tz $10^3$ :ve	25,91
28	Vz $10^4$ Tz $10^4$ :ve	23,86
	Vz $10^4$ Tz $10^5$ :ve	25,96
29	Wasser-PCR	



Die Graphik stellt die im LightCycler nachgewiesene Fluoreszenz der Proben der Spuren 7 bis 11 dar. Die letzte Probe hatte zu Beginn der zweiten Runde bereits die Plateauphase erreicht und ergab deshalb im LightCycler keinen Crossing Point.

Vz=Vektorzellen, Tz=Tumorzellen, Pm=PCR auf Protease M, ve=PCR auf Vektor

**Tabelle 18: Titrationsexperimente mit Tumorzellen in Gesundblut**

Titrationsexperimente: 206F Zellen in Gesundblut							
Experiment	Zugef. Tumorzellen	PCR	Maximale Sensitivität				
			Zugefügte Vektorzellen				
			$10^6$ Vz	$10^4$ Vz	$10^3$ Vz	$10^2$ Vz	no Vz
Se2610	$10 \cdot 10^5$ Cc	25uk					$10^3$
		30uk					$10^2$
		35uk					$10^2$
		30cea					
		35ccsg					$10^5$
Be2510	$10 \cdot 10^5$ Cc, $10^6$ Vz	25uk	$10^3$				
		30uk	$10^3$				
		35uk	$10^3$				
		30cea					
		35ccsg	$10^5$				
Fl2210	$10 \cdot 10^5$ Cc, $10^3$ Vz	25uk				10	
		30uk				10	
		35uk				$10^2$	
		30cea					
		35ccsg				$10^5$	
Xx0411	$10 \cdot 10^5$ Cc	25uk					10
		30uk					$10^2$
		35uk					
		30cea					
		35ccsg					$10^2$
Xx0411	$10 \cdot 10^5$ Cc, $10^2$ Vz	25uk				10	
		30uk				10	
		35uk				$10^2$	
		30cea					
		35ccsg				$10^5$	
Xx0411	$10 \cdot 10^5$ Cc, $10^3$ Vz	25uk			$10^2$		
		30uk			$10^2$		
		35uk			10		
		30cea					
		35ccsg				-	
12.11.	$10 \cdot 10^5$ Cc	25uk					10
		30uk					10
		35uk					10
		30cea					
		35ccsg					$10^5$
12.11.	$10 \cdot 10^5$ Cc, $10^3$ Vz	25uk				10	
		30uk				10	
		35uk				10	
		30cea					
		35ccsg				$10^5$	
12.11.	$10 \cdot 10^5$ Cc, $10^4$ Vz	25uk		10			
		30uk		10			
		35uk		10			
		30cea					
		35ccsg				$10^5$	
07.01.2000	$10^2 \cdot 10^6$ Cc	30cea					$10^3$

Die Tabelle zeigt eine Übersicht der Titrationsexperimente, bei denen unterschiedliche Mengen an 206F Tumorzellen (Cc) in Gesundblut gegeben wurden. Die maximale Sensitivität jeder PCR ist dargestellt.

Als wir verschiedene Mengen 206F Zellen in Wasser verdünnten (siehe 2. Titrationsexperiment), erreichten wir einen quantitativen Nachweis von Protease M für 1:1000, einen nicht quantitativen Nachweis von Ccsg1 für 1:10 (1. Runde 20 Zyklen) und einen quantitativen Nachweis von 1:1000 für die PCR auf CEA (1. Runde 20 und 30). Die erwähnten Experimente und die dabei aufgetretene maximale Sensitivität fast Tabelle 19 zusammen. In der Synopsis 2 läßt sich an einem Beispiel Gelelektrophorese mit Real-time PCR vergleichen.

**Tabelle 19: Titrationsexperimente mit 206F Zellen**

Titrationsexperimente mit 206F Zellen			Max. Sensitivität
Experiment	cDNA-Verdünnung	PCR	ohne Vektorzellen
206F-cDNA 17.1.	206F 1:1, :10, :100, :1000, :10.000	20uk	1:10.000
		30ccsg	1:10
		20cea	1:1000
		35ccsg	1:10

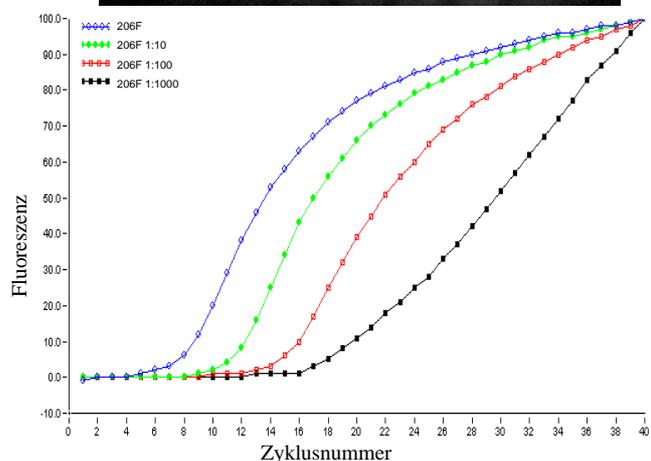
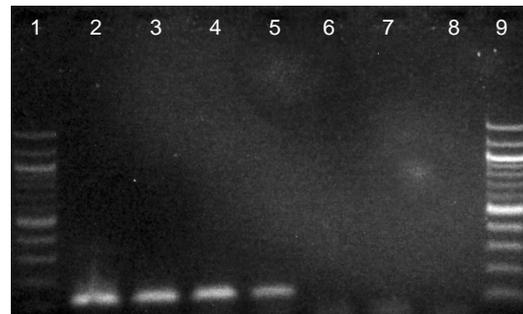
Die Tabelle zeigt die Titrationsexperimente, bei denen die cDNA von 206F Zellen in Wasser verdünnt wurde. Die maximale Sensitivität jeder PCR ist angegeben.

## Synopsis 2: Titrationsexperimente: COLO 206F Zellen in Wasser

Das Foto zeigt eine DNA-Gelelektrophorese aus den Titrationsexperimenten. 206F Zellen wurden in Wasser verdünnt. CEA wurde mit 20 Zyklen in der ersten und 45 Zyklen in der zweiten Runde amplifiziert.

Spur	Name	Crossing Point
2	206F	8,114
3	206F 1:10	11,6
4	206F 1:100	15,1
5	206F 1:1000	16,9
6	206F 1:10,000	
7	1.Runde Wasser	
8	Wasser-PCR	

Die rechte Graphik stellt das entsprechende Fluoreszenzmuster der Proben im LightCycler dar.



Schließlich hatten wir verschiedene Mengen an cDNA, die wir im anfangs erwähnten Experiment gewonnen hatten, in Wasser sowie in der cDNA von unbeimpftem Gesundblut verdünnt. Hierbei ließ die Single round PCR für Protease M (45 Zyklen, inneres Primerpaar, äußeres Primerpaar) eine Nachweisgrenze von  $10^2$  Zellen für das innere Primerpaar und  $10^3$  Zellen für das äußere Primerpaar vermuten. Mit der Single round PCR für Ccsg1 (45 Zyklen, inneres Primerpaar, äußeres Primerpaar) war es uns nicht möglich irgendwelche Zellen nachzuweisen, sofern wir das äußere Primerpaar verwandten. Aber, obgleich nicht quantitativ, 10 Zellen zu detektieren, wenn wir das innere Primerpaar benutzten. Die Single round PCR für CEA (40 Zyklen, inneres Primerpaar, äußeres Primerpaar) erreichte ein Detektionslimit von  $10^5$  Zellen für das äußere Primerpaar, respektive  $10^4$  Zellen für das innere Primerpaar. Anhand dieser Ergebnisse schlußfolgern wir, daß unsere Nested PCR sensitiver als eine entsprechende single round PCR ist.

Die Nested PCR für Protease M (1. Runde 20 Zyklen) detektierte 10 Zellen quantitativ. Die Nested PCR für Ccsg1 (1. Runde 35 Zyklen) konnte, allerdings nicht quantitativ, 10 Zellen nachweisen. Die Nested PCR für CEA (1. Runde 20 Zyklen) erreichte einen quantitativen Nachweis von  $10^4$  Zellen. Die Kontrollzellen kamen hierbei innerhalb einer Streubreite von einer Zykluszahl hoch, was gegen eine Kompetition sprechen würde, die gerade auch von der Zykluszahl der ersten Runde abhängt. Interessanterweise schien es als ob die Nachweisgrenze schmolz, wenn statt ausschließlich Tumorzell-cDNA, Tumorzell- und Kontrollzell-cDNA verwendet wurde. Bei den letztgenannten Experimenten wurde mit einem PCR Mix von 16µl statt der sonst üblichen 18µl gearbeitet, in den 2µl Tumorzell-cDNA und 2µl Vektorzell-cDNA pipettiert wurde. Für Aussagen über eine mögliche Kompetition gilt das oben gesagte. Die durchgeführten Experimente und ihre maximale Sensitivität sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Titrationsexperimente mit cDNA

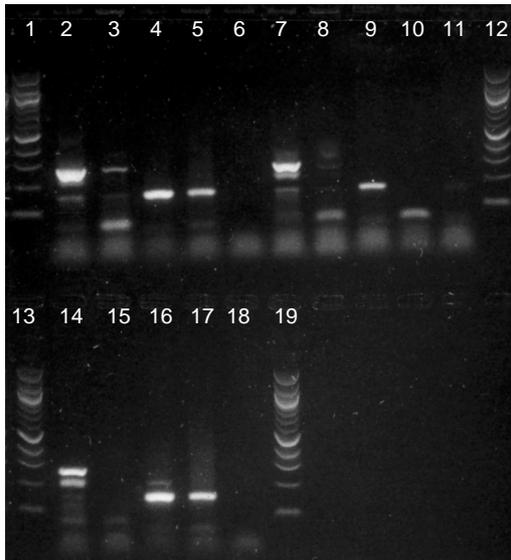
Titrationsexperimente: cDNA in Wasser				
Experiment	cDNA-Verdünnungen	PCR	Maximale Sensitivität	
			Zugeg. Vektorzellen	ohne Vz
			10 <sup>3</sup> Vz	
Titr 10.12.	10 <sup>5</sup> ,2x10 <sup>4</sup> ,4x10 <sup>3</sup> ,8x10 <sup>2</sup> ,16x10	30uk		10
Titr 10.12.	10 <sup>5</sup> ,2x10 <sup>4</sup> ,4x10 <sup>3</sup> ,8x10 <sup>2</sup> ,16x10, 10 <sup>3</sup> Vz	30uk	10	
Titr. 12.12.	10 <sup>5</sup> ,2x10 <sup>4</sup> ,4x10 <sup>3</sup> ,8x10 <sup>2</sup> ,16x10	30uk		10 <sup>2</sup>
Titr. 12.12.	10 <sup>5</sup> ,2x10 <sup>4</sup> ,4x10 <sup>3</sup> ,8x10 <sup>2</sup> ,16x10, 10 <sup>3</sup> Vz	30uk	10	
Titr. 21.12.	10-10 <sup>5</sup> Cc	20uk 25uk 30uk 20ccsg		10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> ; 10 10 <sup>2</sup> 10
Titr. 21.12.	10-10 <sup>5</sup> Cc, 10 <sup>3</sup> Vz	20uk 25uk 30uk	10 10; 10 10	
Titr. 10.1.	10-10 <sup>5</sup> Cc	20uk 20ccsg 20cea		10 10 10 <sup>3</sup>
Titr. 10.1.	10-10 <sup>5</sup> Cc, 10 <sup>3</sup> Vz	20uk 20ccsg 20cea	10 10 10 <sup>4</sup>	
Titr cDNA 18.1. 1R	10-10 <sup>5</sup> Cc	45uk opr 45uk ipr 45ccsg opr 45ccsg ipr 40cea opr 40cea ipr		10 <sup>3</sup> 10 - 10 10 <sup>5</sup> 10 <sup>4</sup>

Die Tabelle stellt eine Übersicht der Titrationsexperimente mit cDNA in Wasser dar. Die maximale Sensitivität jeder PCR ist angegeben. opr=äußere Primer, ipr=innere Primer, Cc=Tumorzellen, Vz=Vektorzellen

### 3.1.4 Real time on-line PCR

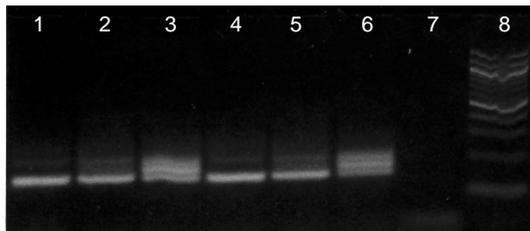
Wir hatten versucht, die Bedingungen der PCR auf Protease M und Ccsg1 zu optimieren. Dabei entdeckten wir zusätzlich zur Bande in erwarteter Höhe weitere Banden in anderen Höhen, die wir zunächst als Ergebnis einer unspezifischen Bindung unserer Sonden bzw. Primer deuteten, und die wir durch eine höhere, stringendere Temperatur ausgleichen wollten. Wie es in der Elektrophorese in Synopsis 3 zu sehen ist, verschwanden die zusätzlichen Banden jedoch nicht, wenn die Annealing Temperatur in der weiter oben erwähnten Weise angehoben wurde. Wir beließen die Annealing Temperatur daraufhin bei 60°C.

### Synopsis 3: Etablierung der PCR auf Protease M und Ccsg1



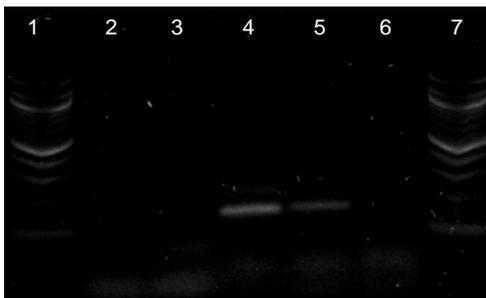
Spur	Inhalt
2	Ccsg1, AT 60°C, -Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
3	Ccsg1, AT 60°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
4	Pm, AT 60°C, -Vz, 10Tz
5	Pm, AT 60°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10Tz
7	Ccsg1, AT 62°C, -Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
8	Ccsg1, AT 62°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
9	Pm, AT 62°C, -Vz, 10Tz
10	Pm, AT 62°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10Tz
14	Ccsg1, AT 64°C, -Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
15	Ccsg1, AT 64°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
16	Pm, AT 64°C, -Vz, 10Tz
17	Pm, AT 64°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10Tz

Das linke Foto zeigt Annealing Temperaturen von 60, 62 und 64°C für Protease M und Ccsg1.



Spur	Inhalt
1	Pm, AT 64°C, -Vz, 10Tz
2	Pm, AT 64°C, -Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
3	Pm, AT 64°C, -Vz, 10 <sup>5</sup> Tz
4	Pm, AT 64°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10Tz
5	Pm, AT 64°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
6	Pm, AT 64°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10 <sup>5</sup> Tz

Das obere Foto zeigt den Einfluß verschiedener Mengen an Tumor- und Vektorzellen auf die zu sehenden Banden bei einer Annealing Temperatur von 64°C.

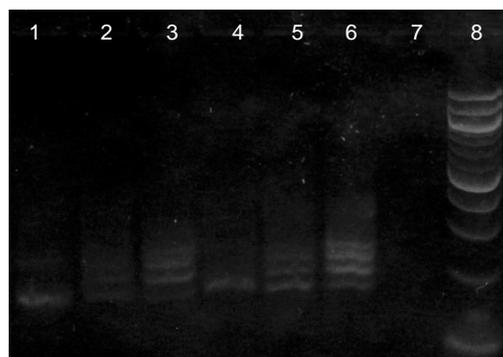


Spur	Inhalt
2	Ccsg1, AT 66°C, -Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
3	Ccsg1, AT 66°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
4	Pm, AT 66°C, -Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
5	Pm, AT 66°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10 <sup>3</sup> Tz

Das linke Foto zeigt eine Annealing Temperatur von 66°C für Protease M und Ccsg1.

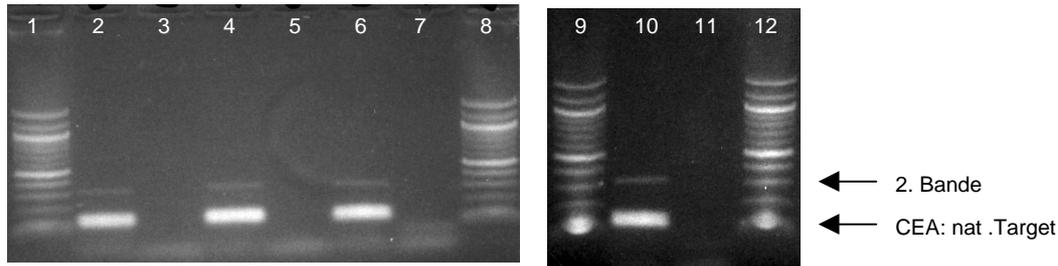
Spur	Inhalt
1	Pm, AT 68°C, -Vz, 10Tz
2	Pm, AT 68°C, -Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
3	Pm, AT 68°C, -Vz, 10 <sup>5</sup> Tz
4	Pm, AT 68°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10Tz
5	Pm, AT 68°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10 <sup>3</sup> Tz
6	Pm, AT 68°C, 10 <sup>3</sup> Vz, 10 <sup>5</sup> Tz

Das rechte Foto zeigt eine Annealing Temperatur von 68°C für Protease M. Bei dieser Annealing Temperatur war keine Fluoreszenz mehr zu detektieren.



Bei der PCR auf CEA erhielten wir die besten Crossing Points, wenn wir die Hydrolysierungssonde verwendeten, die wir daraufhin für die Untersuchungen an Patienten auswählten. Für die kombinierte Hybridisierungssonde/Primer erwies sich eine  $MgCl_2$  Konzentration von 3mmol in beiden Runden der Nested PCR als optimal. Auch für die Hydrolysierungssonde erwies sich eine  $MgCl_2$  Konzentration von 3mmol in beiden Runden der Nested PCR als optimal. In diesem Ansatz variierten wir zusätzlich die Annealing Temperatur. Wie es in der Elektrophorese in Synopsis 4 zu sehen ist, verschwindet die zusätzliche Bande bei ungefähr 300 - 400bp nicht, wenn die Temperatur von 65° bis zu 72°C anhebt. Da allerdings keine derartige Bande in der Elektrophorese zu sehen ist, wenn die Amplifizierung mit SYBR Green I anstatt der Hydrolyse Sonde durchgeführt wird, wurde geschlossen, daß die zusätzliche Bande eine Folge der Hydrolyse Sonde sein könnte.

#### Synopsis 4: Etablierung der PCR auf CEA

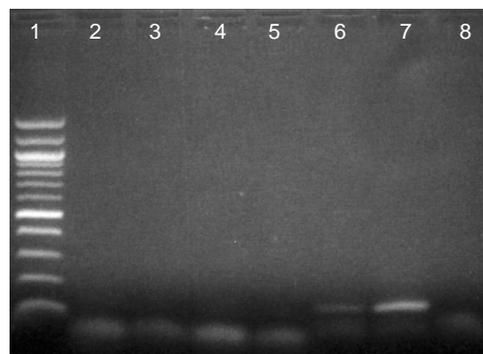


Spur	Inhalt
2	CEA, AT 65°C, Tz, -Vz
4	CEA, AT 67°C, Tz, -Vz
6	CEA, AT 69°C, Tz, -Vz
10	CEA, AT 72°C, Tz, -Vz

Die oberen Fotos zeigen, daß die zweite Bande zwischen 300 und 400bp nicht verschwindet, wenn die Annealing Temperatur bis auf 72°C angehoben wird.

Spur	Inhalt
2	CEA, AT 65°C, $10^4$ Tz, -Vz
3	CEA, AT 65°C, $10^4$ Tz, $10^3$ Vz
6	CEA, AT 65°C, $10^4$ Tz, -Vz
7	CEA, AT 65°C, $10^4$ Tz, $10^3$ Vz

Die rechte Abbildung zeigt eine PCR bei der zur Detektion statt der Hybridisierungssonden SYBR Green genommen wurde. Im Gegensatz zu den oben gezeigten PCRs läßt sich hier keine zweite Bande erkennen.



Wir gehen aufgrund dieser Ergebnisse davon aus, einen aussagekräftigen Ansatz etabliert zu haben.

## **3.2 Ergebnisse an Patientenproben**

In vielen Veröffentlichungen wurde der Nachweis zirkulierender kolorektaler Tumorzellen mittels RT-PCR auf CEA und viele andere mRNA-Marker beschrieben und diskutiert. Doch kaum eine Arbeit hatte bisher die Möglichkeiten des LightCyclers ausgetestet, diesen Nachweis zu vereinfachen. Es war unklar, ob Protease M sich hierzu eignen würden und dabei besser als CEA abschneiden würde. Aufgrund der unzureichenden Sensitivität von Ccsg1 bei den Titrationsexperimenten ließen wir davon ab, sie am Patientengut weiter zu explorieren. Dabei sei angemerkt, daß Protease M möglicherweise in 206F-Zellen überexprimiert wird, in der größeren Zahl der kolorektalen Tumoren dies aber nicht der Fall sein muß, und daß für Ccsg1 eventuell das umgekehrte gelten könnte.

### **3.2.1 Kolongewebe**

Die PCR auf Protease M und CEA ließen wir zunächst mit 30 Zyklen in der ersten Runde laufen. Da der Prozeß der Amplifizierung bei einigen Proben hierbei allerdings bereits die Plateauphase erreicht hatte, verdünnten wir die cDNA 1:10 mit Wasser und amplifizierten sie dann erneut, diesmal mit 25 Zyklen in der ersten Runde. Die erhaltenen Ergebnisse erscheinen in den Diagrammen 1 und 2.

Kolongewebe: 1. Runde nested PCR: 30 Zyklen

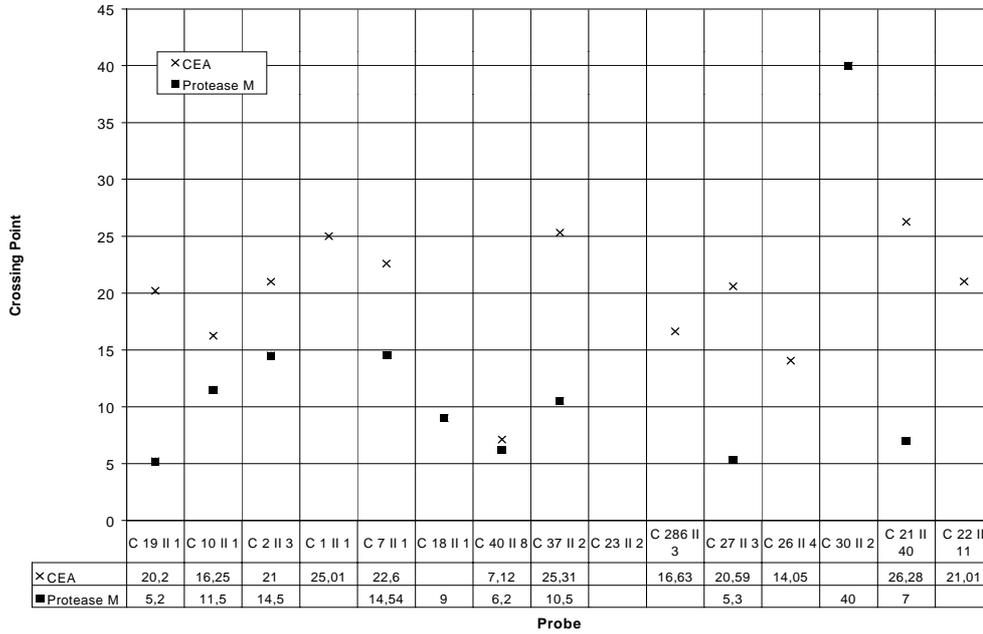


Diagramm 1: Kolongewebe: 1. Runde Nested PCR: 30 Zyklen

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Gewebeprobe. Die ersten sechs Proben sind gesundes Kolongewebe, die letzten neun neoplastisches.

Kolongewebe: 1:10, 1. Runde nested PCR: 25 Zyklen

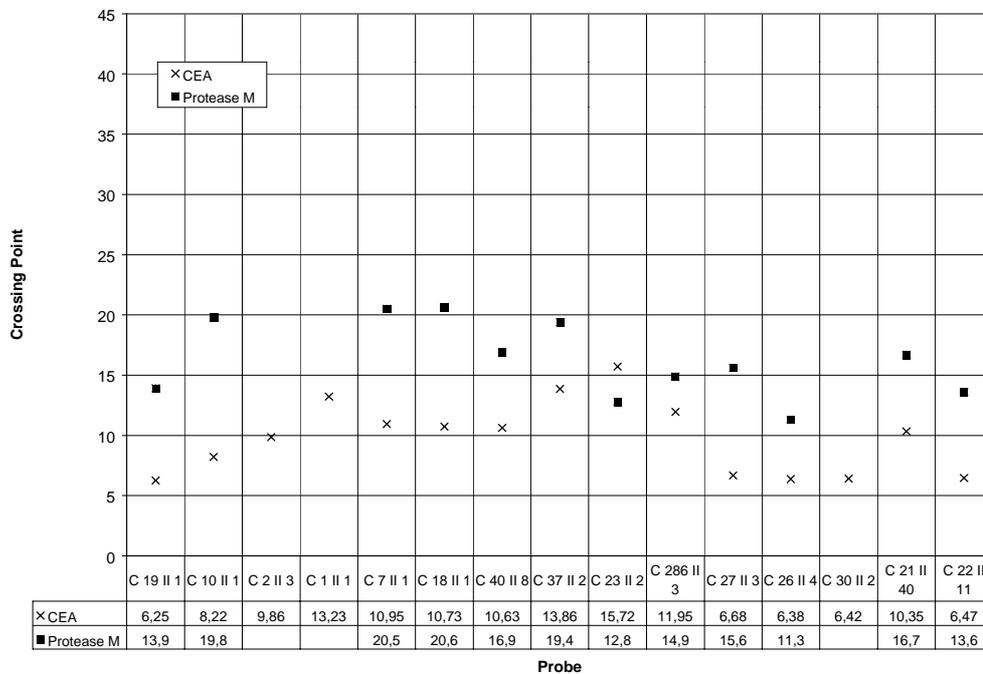


Diagramm 2: Kolongewebe: 1. Runde Nested PCR: 25 Zyklen

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Gewebeprobe. Die ersten sechs Proben sind gesundes Kolongewebe, die letzten neun neoplastisches.

Während die Crossing Points bei Protease M in der zweiten PCR mit 25 Zyklen später kamen als in der ersten PCR mit 30 Zyklen, verlief dies bei CEA umgekehrt. Da außerdem die Crossing Points bei der ersten PCR verstreuter lagen als bei der zweiten mit 25 Zyklen, lief die erste PCR auf CEA möglicherweise nicht optimal. In der PCR mit 25 Zyklen liegen die Crossing Points für CEA fast alle niedriger als für Protease M. Bei dieser PCR liegt der Durchschnitt der Crossing Points bei den Proben aus gesundem Gewebe für CEA bei 9,9, für Protease M bei 18,7, bei den Proben aus neoplastischem Gewebe für CEA bei 9,8, für Protease M bei 15,2.

### **3.2.2 Gesundblut**

In sieben Blutproben gesunder Spender versuchten wir CEA-mRNA nachzuweisen. Dabei benutzten wir zunächst 35 Zyklen in der ersten Runde, später dann 20 Zyklen. Die zweite Runde ließen wir über 70 Zyklen laufen, um möglichst sicher gehen zu können, auch ein schwach positives Ergebnis nicht zu übersehen. Eine von sieben (14%) Proben wurde positiv.

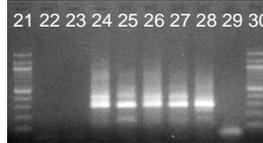
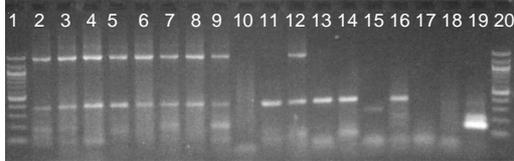
### **3.2.3 Patientenblut**

Wir schlossen 16 Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom (Dukes D) in unsere Untersuchungen ein, die zum Zeitpunkt der Blutabnahme mit Chemotherapie behandelt wurden. Da in vorangehenden Arbeiten am Malignen Melanom gezeigt worden war, daß bei Patienten, die unter Chemotherapie stehen, der Nachweis von Tumorzellen schwieriger sein kann, als bei solchen ohne Chemotherapie, evaluierten wir von diesen zusätzlich acht. Relevante Patientendaten sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Zwei 9 - 10ml Proben peripheren venösen Blutes wurden pro Patient abgenommen und aufgearbeitet. Nested RT-PCR wurde auf Protease M, CEA und die entsprechenden künstlichen Targets durchgeführt. Die erste Runde erfolgte mit jeweils 35 Zyklen. Die DNA-Gelelektrophorese der Amplifikate wurde ohne Wissen der entsprechenden Crossing Points beurteilt. Einen Überblick der Ergebnisse liefern die Tabellen 21, 22, 23 und 24 sowie die Diagramme 3, 4 und 5. Die Gelelektrophorese ausgewählter Proben ist in Synopsis 5 dargestellt.

## Synopsis 5: Patientenblut: ID100 – 104

Auf dieser Seite sind die Gelelektrophoresen der Amplifikate der PCR-Läufe der Patienten ID100-104 zusammengefaßt. Pm=PCR auf Protease M, CEA=PCR auf CEA, PBG-D=PCR auf PBG-D, ve=PCR auf Vektor

### PCR auf Protease M



### PCR auf CEA



### PCR auf PBG-D



Spur	Protease M	CEA	PBG-D
1	DNA Marker	DNA Marker	DNA Marker
2	ID100, Pm	ID100, CEA	ID100, PBG-D
3	ID100v, Pm	ID100v, CEA	ID100v, PBG-D
4	ID101, Pm	ID101, CEA	ID101, PBG-D
5	ID101v, Pm	ID101v, CEA	ID101v, PBG-D
6	ID102, Pm	ID102, CEA	ID102, PBG-D
7	ID102v, Pm	ID102v, CEA	ID102v, PBG-D
8	ID104, Pm	ID104, CEA	ID104, PBG-D
9	ID104v, Pm	ID104v, CEA	ID104v, PBG-D
10	ID100, -RT	ID100, -RT	ID100, -RT
11	ID100v, -RT	ID100v, -RT	ID100v, -RT
12	ID101, -RT	ID101, -RT	ID101, -RT
13	ID101v, -RT	ID101v, -RT	ID101v, -RT
14	ID102, -RT	ID102, -RT	ID102, -RT
15	ID102v, -RT	ID102v, -RT	ID102v, -RT
16	ID104, -RT	ID104, -RT	ID104, -RT
17	ID104v, -RT	ID104v, -RT	ID104v, -RT
18	-RNA Kontr.	-RNA Kontr.	-RNA Kontr.
19	pos Kontr.	pos Kontr.	pos Kontr.
20	DNA Marker	DNA Marker	DNA Marker
21	DNA Marker	DNA Marker	
22	-DNA Kontr.	-DNA Kontr.	
23	-DNA Kontr.	-DNA Kontr.	
24	ID100v, ve	ID100v, ve	
25	ID101v, ve	ID101v, ve	
26	ID102v, ve	ID102v, ve	
27	ID104v, ve	ID104v, ve	
28	pos Kontr.	pos Kontr.	
29	-DNA Kontr.	-DNA Kontr.	
30	DNA Marker		
31		DNA Marker	

**Tabelle 21: Patientenblutproben: Protease M**

Patient Nr.	ID	Pm, natürliches Target			Pm, Vektor		Pm, -RT		
		Ct	Gel 152bp	~400bp ~1,2kbp	Ct	Gel 298bp	Ct	Gel 152bp	~400bp ~1,2kbp
1	84 84v		x	xx				x	xxx
2	85 85v		x				27,9	x	xx
3	86 86v		x	xxx	25,47	xx	27,96	x	xx
4	87 87v		x	xxx	25,13	xx		x	xx
5	88 88v		x				33,23	x	xxx
6	89 89v		x	x	16,05	xxx	31,84	x	x
7	90 90v	39,54	x		20,76	xxx	39,29	x	
8	91 91v				36,06	x			
9	92 92v		x						
10	93 93v		x		25,68	x			
11	94 94v		x		20,99	xx			
12	95 95v		x		35,34	x			
13	96 96v	36,26	x	x	28,55	xx			x
14	97 97v	35,11	x	xxx	25,44	xxx	40,23	xx	
15	98 98v		xx			x	40,65		xx
16	99 99v	33,49	xxx	x	22,25	xxx		xx	
17	100 100v	26,41 25,54	x	xxx	29,7	x		xx	
18	101 101v	25,94	x	xxx	15,66	xxx			xxx
19	102 102v	24,70 28,80		xxx	18,11	xxx			xxx
20	104 104v	24,75 28,40		xxx	18,55	xxx			xxx
21	105 105v	25,64	x	xxx	21,09	xxx	27,59	x	xx
22	106 106v	27,94	x	xxx	16,49	xxx	38,28	x	xxx
23	107 107v	32,39 15,75	x	xxx	34,08	xxx	34,08	x	xxx
24	108 108v	17,30 13,63	x	x	17,13	xxx	36,85	x	xx
				xx	19,19	xx	24,92	x	x
				xx	13,63	xxx	19,74	x	x
							20,69	x	x

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der PCR-Läufe und der entsprechenden Gelelektrophoresen für Protease M.

**Tabelle 22: Patientenblutproben: CEA**

Patient Nr.	ID	CEA, natürliches Target		CEA, Vektor		CEA, -RT	
		Ct	Gel 131bp	Ct	Gel 194bp	Ct	Gel 131bp
1	84						
	84v						
2	85	28,15	x				
	85v		x	6,39	xxx		
3	86						
	86v			7,12	xxx		
4	87						
	87v			9,54	xxx		
5	88	26,66	x				
	88v	36,17		7,17	xxx		
6	89	12,95	xx				
	89v	20,07	xx	6,69	xxx		
7	90	27,03	x				
	90v			11,48	xxx		
8	91	37,8	x				
	91v			7,64	xxx		
9	92						
	92v			6,3	xxx		
10	93						
	93v			7,49	xxx		
11	94		x				
	94v			8,29	xxx		
12	95		x				
	95v		x	7,45	xxx		
13	96						
	96v			7,06	xxx		
14	97	29,65	xx				
	97v	34,84	x	12,31	xxx		
15	98						
	98v			5,68	xxx		
16	99	14,01	xxx				
	99v	11,09	xx	5,76	xxx		
17	100	29,31	xx				
	100v			11,81	xxx		
18	101		xx				
	101v	29,96	x	13,64	xxx		
19	102	24,78	xxx				
	102v	25,32	xx	13,04	xxx		
20	104	31,96	x				
	104v			12,13	xxx		
21	105						
	105v	27,24	x	11,57	xxx		
22	106	32,12	x				
	106v	23,25	x	10,15	xxx		
23	107	19,51	xxx				
	107v			10,51	xxx		x
24	108						
	108v			10,46	xxx		

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der PCR-Läufe und der entsprechenden Gelelektrophoresen auf CEA.

**Tabelle 23: Patientenblutproben: PBG-D**

Patient Nr.	ID	-RT PBG-D		PBG-D	
		Gel ~290bp	Ct	Gel 187bp	Ct
1	84	xxx	29,07	xxx	22,08
	84v	x		xxx	26,10
2	85	xxx	25,72	xxx	22,83
	85v	xxx	25,50	xxx	23,19
3	86			xxx	24,14
	86v	x	30,45	xxx	22,73
4	87	xx	29,57	xxx	20,92
	87v	x		xxx	22,24
5	88	x		xxx	23,86
	88v	xxx	26,86	xxx	23,90
6	89			xxx	21,73
	89v	xx	29,81	xxx	22,50
7	90	x		xxx	22,23
	90v	x		xxx	23,71
8	91			xxx	21,50
	91v	x		xxx	21,96
9	92	xxx	25,66	xxx	21,01
	92v	xxx	26,78	xxx	21,81
10	93	x		xxx	21,20
	93v			xxx	21,67
11	94	xx	30,08	xxx	21,07
	94v			xxx	21,59
12	95	xxx	23,45	xxx	22,04
	95v	xx	29,85	xxx	22,86
13	96	x	34,26	xxx	21,89
	96v			xxx	22,58
14	97	x		xxx	20,58
	97v	x		xxx	21,04
15	98	x		xxx	21,88
	98v			xxx	22,10
16	99			xxx	23,12
	99v	xxx	28,80	xxx	22,90
17	100	x		xxx	22,72
	100v	x		xxx	22,72
18	101	x		xxx	22,68
	101v			xxx	22,16
19	102	x		xxx	22,69
	102v	x		xxx	22,92
20	104	xx		xxx	23,51
	104v			xxx	23,45
21	105	xxx	29,21	xxx	21,62
	105v	x		xxx	21,92
22	106	xx		xxx	21,99
	106v	xx		xxx	21,90
23	107	xx	31,01	xxx	22,80
	107v	xxx	23,90	xxx	22,18
24	108	xxx	25,19	xxx	22,36
	108v	xxx	24,98	xxx	22,30

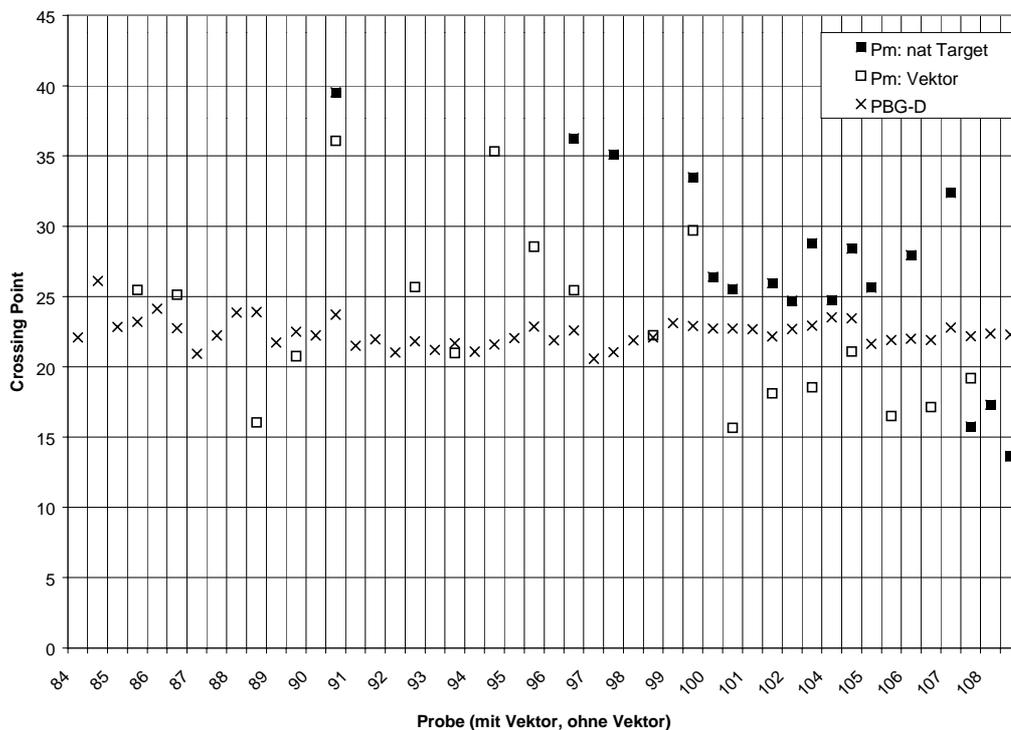
Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der PCR-Läufe und der entsprechenden Gelelektrophoresen auf PBG-D. Während bei der -RT-Kontrolle eine Bande ausschließlich in Höhe der gDNA (~290bp) zu sehen war, erschien bei den regulären Läufen eine Bande ausschließlich in Höhe der cDNA (187bp).

**Tabelle 24: Patientenblutproben: PBG-D,  
Ergebnisse nach wiederholter cDNA-Synthese**

Patient Nr.	Patient ID	-RT (PBG-D)	
		Gel 187bp	Ct
1	84		30,51
2	85		27,33
	85v		26,37
4	87		30,65
	87v		27,68
5	88		
	88v		27,61
6	89		
	89v		30,38
13	96v		
14	97		
15	98v		
16	99		

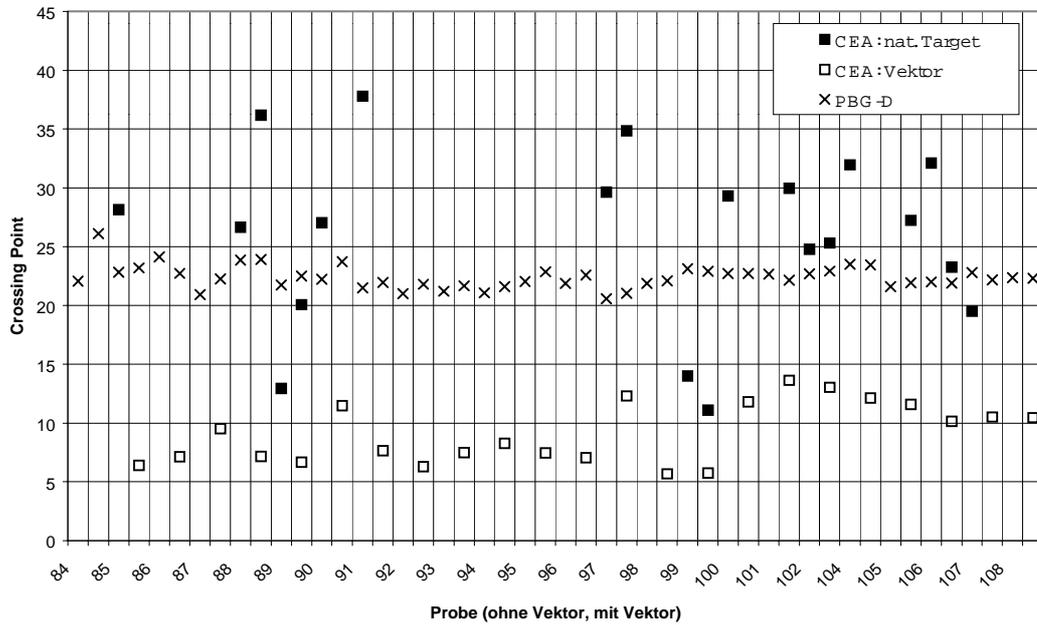
Die Tabelle 24 zeigt die Crossing Points und die entsprechenden Ergebnisse der Gelelektrophorese der Proben, deren cDNA-Synthese ohne zusätzlichen DNase-Verdau wiederholt wurde.

**Patientenblutproben: Protease M**



**Diagramm 3: Vergleich Pm: künstliches Target, nat. Target, Housekeeping Gen**  
Das Diagramm stellt die Crossing Points der Blutproben der Patienten für das natürliche und künstliche Target von Protease M den Crossing Points des Housekeeping Gens PBG-D gegenüber.

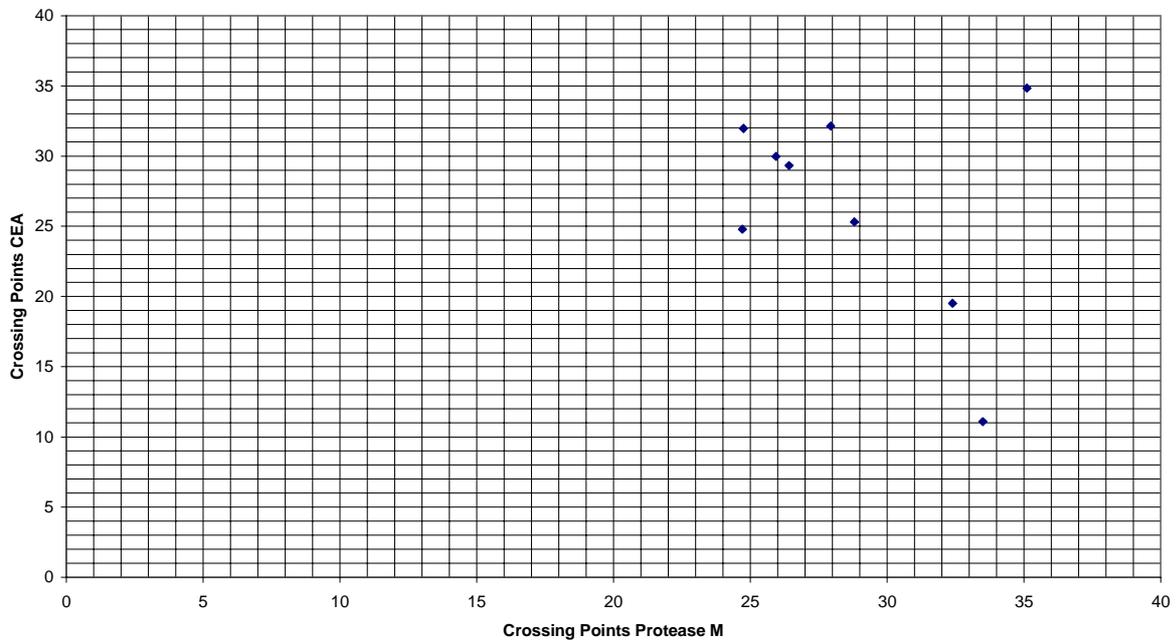
## Patientenblutproben: CEA



**Diagramm 4: Vergleich CEA: künstl. Target, nat. Target, Housekeeping Gen**

Das Diagramm stellt die Crossing Points der Blutproben der Patienten für das natürliche und künstliche Target von CEA den Crossing Points des Housekeeping Gens PBG-D gegenüber.

## Patientenblutproben: Protease M und CEA (natürliches Target)



**Diagramm 5: Patientenblutproben: Vergleich Protease M, CEA, nat. Target**

Das Diagramm stellt die Crossing Points für das natürliche Target von Protease M den entsprechenden Crossing Points von CEA bei den Blutproben der Patienten gegenüber. (Korrelationskoeffizient  $\rho = -0,050$ ,  $p$ -Wert =  $0,8875$ )

Bei sieben von sechzehn Patienten mit Chemotherapie (44%) und bei sieben von acht Patienten ohne Chemotherapie (88%) ließ sich CEA in mindestens einer Probe nachweisen. Die Existenz einer Bande in Höhe des Amplifikats der CEA-cDNA (131bp) deckte sich dabei weitgehend mit einem Fluoreszenznachweis im LightCycler (Crossing Point). Bei vier Patienten mit Chemotherapie (ID 88, 89, 97, 99) und Zweien ohne Chemotherapie (ID 102, 106) konnte CEA in beiden Blutproben amplifiziert werden. Dabei erschien der Crossing Point für diejenige Probe, die mit Vektorzellen versetzt worden war später als für diejenige ohne Vektorzellen. Eine Ausnahme bildet hier Patient ID 99, dessen Banden in der Gelelektrophorese sich aber so verhielten wie beschrieben. Wir vermuteten eine Konkurrenz zwischen natürlichem und künstlichem Target in der ersten Runde der PCR. Um diese Konkurrenz abzuschwächen, wiederholten wir bei ausgewählten Proben die erste Runde mit 25 Zyklen. Die Konkurrenz nahm daraufhin ab.

Das künstliche Target von CEA ließ sich in 23 der 24 Patienten (96%) nachweisen. Dabei lag der Crossing Point für die Patienten ohne Chemotherapie durchschnittlich bei 7,8, während er bei den übrigen im Durchschnitt 11,7 erreichte. In der Gelelektrophorese lieferte das nachgewiesene Target durchweg eine einzige deutliche Bande in Höhe der 194bp. Wir folgern daraus, daß die Aufarbeitung der Proben ab dem Schritt, bei dem die Vektorzellen zugegeben worden waren, effizient verlief.

Die –RT-Kontrollen, die z.B. auch eine Kontamination durch gDNA anzeigen sollten, waren negativ. Dieses Ergebnis beweist allerdings nicht die Abwesenheit von gDNA, weil unsere Primer auf DNA-Ebene eine Sequenz von ca. 2,0kb umschließen, die höchstwahrscheinlich zu groß ist, um in unserer PCR amplifiziert werden zu können.

Bei vier von sechzehn Patienten mit Chemotherapie (25%) und bei acht von acht Patienten ohne Chemotherapie (100%) ließ sich eine vom Protease M-Gen abstammende Sequenz detektieren. Dabei deckte sich der Nachweis einer Bande in Höhe des Amplifikats von Protease M-cDNA (152bp) nicht mit dem Nachweis einer Fluoreszenz im LightCycler. Das natürliche Target bei 152bp war im Gel bei den meisten Proben nur schwer auszumachen. Bei vielen Patienten traten zusätzliche, nicht erwartete Banden auf. Dabei möchten wir zwei Banden bei ~1200bp und

~400bp, die bei den meisten Patienten ohne Chemotherapie in der Gelelektrophorese der Amplifikate des natürlichen Targets deutlich in Erscheinung traten, diskutieren. Nachdem wir die Existenz von Crossing Points und zusätzlichen Banden verglichen hatten, kamen wir zum Schluß, daß keine der beiden Banden gut mit einem Fluoreszenznachweis korrelierte. Auffällig war, daß bis auf eine einzige Ausnahme, die 1200bp Bande bei den –RT-Kontrollen nicht auftrat. Bei dieser Ausnahme wurde weder in der RT positiven noch in der RT negativen Probe eine Fluoreszenz gemessen. Die Bande in Höhe der ca. 400bp könnte zunächst als gDNA gedeutet werden, allerdings müßten dann auch die –RT-Kontrollen von PBG-D bei den entsprechenden Fällen positiv sein. Dies war nicht der Fall. Bei fünf der acht Patienten ohne Chemotherapie ließ sich in beiden Proben, mit und ohne Vektorzellen, ein Fluoreszenzanstieg belegen. Dabei war in zwei Fällen der Crossing Point der Probe mit Vektorzellen höher als der ohne Kontrollzellen, während es bei dreien umgekehrt war.

Das Amplifikat des Vektors ließ sich in 20 der 24 Patienten im LightCycler detektieren. Dabei erschien es durchgehend deutlich nur bei den Patienten ohne Chemotherapie. Bei diesen konnten allerdings zusätzliche Banden beobachtet werden. Der Crossing Point lag bei den Patienten mit Chemotherapie durchschnittlich bei 26,0, bei den Übrigen im Durchschnitt bei 17,5. Im Vergleich zum Vektorprodukt von CEA streuten die Crossing Points sehr viel mehr und lagen im Durchschnitt sehr viel höher. Wir schlossen daraus, daß die Effizienz der PCR auf das Vektorkonstrukt von Protease M niedrig war.

Die –RT-Kontrolle war bei 15 der insgesamt 48 Proben der 24 Patienten positiv. Unter den Patienten mit Chemotherapie war dies bei zwei Patienten in beiden Proben, bei vier Patienten in einer Probe der Fall. Unter denen, die nicht unter Chemotherapie standen waren in drei Fällen beide Proben, in einem Fall eine Probe positiv. Die Ursache für dieses Kontaminationsproblem konnten wir zunächst nicht ermitteln. Wir vermuteten eine Kontamination durch genomische DNA und wiederholten die cDNA-Synthese von 14 Proben. Die 1200bp Bande war auch bei einer und die 400bp Bande bei fünf der –RT-Kontrollen dieser Patienten zu sehen. Die neu gewonnene cDNA untersuchten wir auf PBG-D. Die Ergebnisse ähnelten sehr denen der ersten cDNA-Synthese. Wir schlossen aus den Ergebnissen der

ersten und zweiten cDNA-Synthese, daß eine Kontamination durch gDNA vorlag. Diese Kontamination schrieben wir der Unwirksamkeit der DNase bei der Aufarbeitung der Proben zu, die zwar anscheinend die DNA so weit abgebaut hatte, daß sie nicht mehr bei der RNA-Gelelektrophorese zu sehen gewesen war, aber noch im LightCycler amplifiziert werden konnte.

Bei der PCR auf das Housekeeping Gen, in diesem Fall PBG-D, lagen die Crossing Points der Patientenproben bis auf eine Ausnahme zwischen 20 und 24, und belegten damit die gleichmäßige Qualität der Aufarbeitung der Proben. In der Gelelektrophorese entsprach den Crossing Points eine einzige gleichmäßig deutliche Bande in Höhe von 187bp, die wir als Amplifikat der cDNA deuteten.

Unter den –RT-Kontrollen ließ sich bei 19 der insgesamt 48 Proben im LightCycler ein Fluoreszenzanstieg nachweisen. Bei diesen 19 Proben fand sich fast durchweg eine einzige deutliche Bande in der Gelelektrophorese. Aber auch bei 19 weiteren Proben fand sich eine einzelne schwache Bande. Die Bande lag in jedem Fall in Höhe der gDNA bei ca. 290bp. Bei einigen Proben hatten wir, ohne einen zusätzlichen DNase-Verdau, die cDNA-Synthese wiederholt. Im Vergleich zur ersten cDNA-Synthese waren fast alle ebenso stark positiv geblieben. Die Positivität begründeten wir im Vorliegen von gDNA.

Wählt man unter allen 48 Proben diejenigen aus, bei denen die –RT-Kontrolle im LightCycler weder bei Protease M noch bei CEA oder PBG-D einen Crossing Point lieferte, und läßt man dabei die Banden in der Gelelektrophorese außer Betracht, läßt sich folgendes bemerken: Es sind 23 Proben, nämlich ID 84v, 86, 88, 90, 90v, 91, 91v, 93, 93v, 94v, 97, 98, 98v, 99, 100, 100v, 101, 101v, 102, 102v, 104, 104v und 106v. 14 Proben stammen aus der Gruppe mit Chemotherapie, neun aus der Gruppe ohne Chemotherapie. Protease M ließ sich in acht Proben nachweisen (35%), CEA in 10 Proben (43%). Unter den Patienten mit Chemotherapie war der Crossing Point von CEA bei Vieren niedriger als bei Protease M. Bei einer war es umgekehrt. Bei den übrigen neun ließ sich weder CEA noch Protease M detektieren. War kein Crossing Point angegeben, wurde er als später gekommen gewertet. Unter den Patienten ohne Chemotherapie lag der Crossing Point für CEA bei zwei Proben niedriger als der für Protease M. Bei sechs war es umgekehrt. Bei einem ließ sich weder CEA noch Protease M nachweisen. Über das Kollektiv von Patienten ohne

Chemotherapie läßt sich also feststellen, daß Protease M sensitiver als CEA war. Bei dem Kollektiv unter Chemotherapie verhielt es sich umgekehrt.

Bei denjenigen Patientenblutproben, bei denen sowohl für das natürliche Target von Protease M als auch für das von CEA Crossing Points vorlagen, wurden diese als kontinuierliche Variablen mit nicht-parametrischer Verteilung anhand des Spearman-Tests mit Hilfe des Programmes Statview verglichen. Dabei ergab sich ein Korrelationskoeffizient  $\rho = -0,050$ , sowie ein p-Wert = 0,8875. Da  $p > 0,05$  liegt somit keine statistischen Signifikanz vor.

Alle –RNA- und –DNA-Kontrollen der PCR-Läufe auf Protease M, CEA und PBG-D waren sowohl bei dem Fluoreszenznachweis im LightCycler als auch in der Gelelektrophorese negativ. Wie schon erwähnt, lassen sich Kreuzkontaminationen allerdings nie vollständig ausschließen.

### **3.3 Analyse der Schmelzkurve**

Durch die Analyse der Schmelzkurve der PCR auf  $\beta 2m$  konnten wir unspezifische Amplifikate bei diesen PCR-Läufen detektieren und die Ergebnisse der Analyse entsprechend korrigieren.

### **3.4 Standardkurven**

Standardkurven konnten für die in vitro Transkripte der natürlichen und künstlichen Targets von CEA und Protease M erstellt werden. Die Standardkurven zeigen, daß das natürliche Target von Protease M über fünf Titerstufen hinweg konstant amplifiziert werden konnte, respektive drei Titerstufen bei CEA. Dabei ließ sich Protease M zwei Stufen früher gleichbleibend detektieren als CEA. Dieser Unterschied wird wahrscheinlich durch eine verschiedene Effizienz der PCR begründet, möglicherweise als eine Folge der verschiedenen Sondenchemie. Die künstlichen Targets beider Transkripte konnten über fünf Titerstufen hinweg konstant amplifiziert werden. Die Sensitivität war dabei die gleiche. Die Ergebnisse der Standardkurven fast Tabelle 25 und 26 zusammen. In der Synopsis 6 werden die im LightCycler gewonnenen Daten am Beispiel des natürlichen Targets von Protease M der Gelelektrophorese gegenübergestellt.

**Tabelle 25: Ergebnisse der Standardkurven I**

Probe	Ct Durchschnitt			
	Nat. Target		Art. Target	
	Pm	CEA	Pm	CEA
1,5pg		5,1	7,2	
1,50E-01pg	5,6	8,96	11,6	8,0
1,50E-02pg	9,4	12,6	14,8	11,9
1,50E-03pg	13,8	17,1	18,6	15,7
1,50E-04pg	17,3	24,6	21,7	19,995
1,50E-05pg	20,7		24,95	24,1
1,50E-06pg				

Die Tabelle zeigt die durchschnittlichen Crossing Points der Standardverdünnungen der *in vitro* Transkripte von Protease M und CEA.

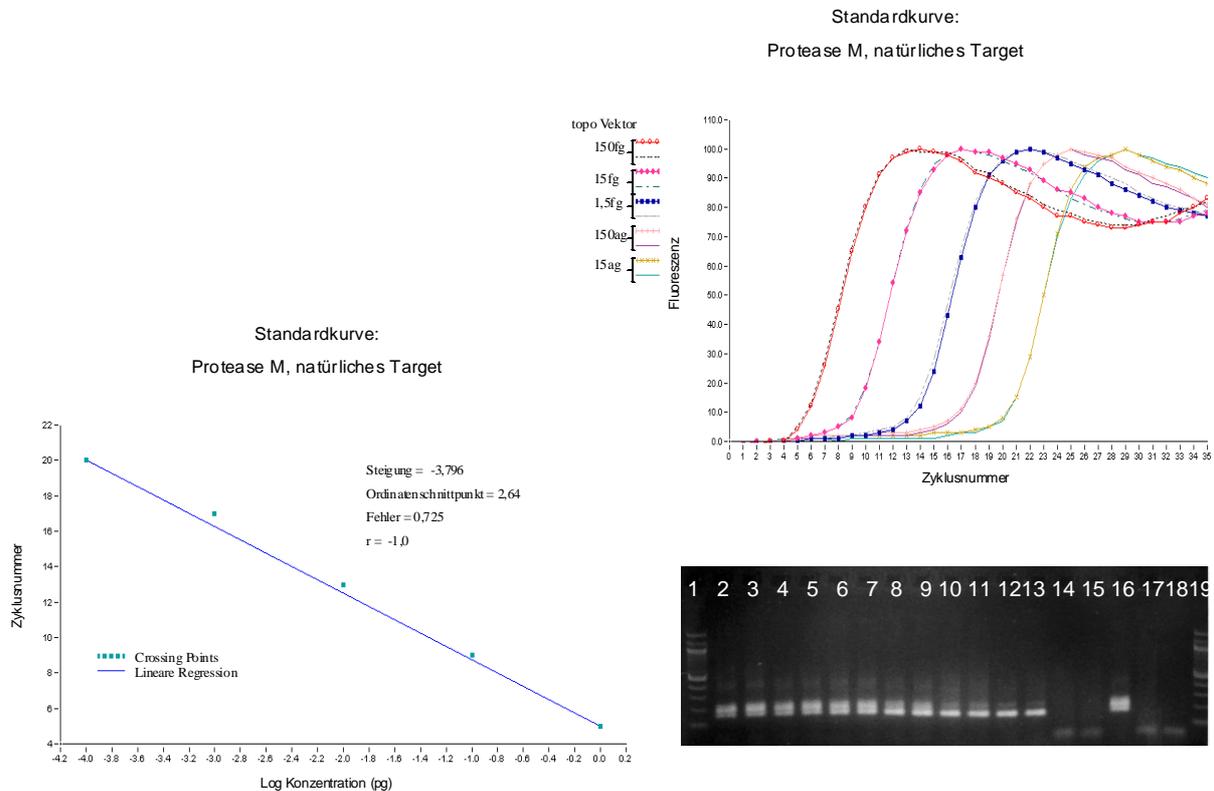
**Tabelle 26: Ergebnisse der Standardkurven II**

Proben	Ct Intervalle			
	Nat. Target		Art. Target	
	Pm	CEA	Pm	CEA
1,5 auf 1,50E-01*	5,6	3,9	4,4	
1,50E-01 auf 1,50E-02	3,8	3,6	3,2	3,9
1,50E-02 auf 1,50E-03	4,4	4,5	3,7	3,8
1,50E-03 auf 1,50E-04	3,4	7,4	3,1	4,3
1,50E-04 auf 1,50E-05	3,4		3,3	4,1
1,50E-05 auf 1,50E-06				

Die Tabelle zeigt die Intervalle der Crossing Points zwischen den Titerstufen. \*Angaben in pg

## Synopsis 6: natürliches Target von Protease M

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Verdünnungen der *in vitro* Transkripte des natürlichen Targets von Protease M und die daraus berechnete Konzentration der Titerstufen. Die Diagramme zeigen den Fluoreszenznachweis im LightCycler und die daraus berechnete Standardkurve. In der Gelelektrophorese sind die Amplifikate in der entsprechenden Höhe (152bp) gut zu erkennen.



### Natürliches Target Protease M

Spur	Titerstufe	Standard (Konzentration in pg)	Errechnete Konzentration	Ct
2	topo vektor 1,5pg	1,5		
3	topo vektor 1,5pg	1,5		
4	topo vektor 150fg	1,5 E-1	1,21 E-1	5,6
5	topo vektor 150fg	1,5 E-1	1,25 E-1	5,6
6	topo vektor 15fg	1,5 E-2	1,49 E-2	9,4
7	topo vektor 15fg	1,5 E-2	1,51 E-2	9,4
8	topo vektor 1,5fg	1,5 E-3	1,28 E-3	13,9
9	topo vektor 1,5fg	1,5 E-3	1,41 E-3	13,7
10	topo vektor 150ag	1,5 E-4	2,03 E-4	17,3
11	topo vektor 150ag	1,5 E-4	2,01 E-4	17,3
12	topo vektor 15ag	1,5 E-5	3,09 E-5	20,7
13	topo vektor 15ag	1,5 E-5	3,15 E-5	20,7
14	topo vektor 1,5ag	1,5 E-6		
16	topo vektor 1,5ag	1,5 E-6		
17	Wasser 1. R.			
18	Wasser			