

3 Ergebnisse

3.1 Methodische Ergebnisse

3.1.1 RNA Isolierung aus Vollblut

3.1.1.1 RNA-Ausbeute

Zur Optimierung der RNA-Ausbeute wurden bei der RNA-Isolierung aus Vollblut verschiedene Ausfällungsbedingungen miteinander verglichen. Abb. 3.1 zeigt die Verteilung der photometrisch gemessenen RNA-Konzentration von der Dauer und der Temperatur der Ausfällung mit Isopropanol. Bei Betrachtung der Blutproben wird deutlich, daß die Ausfällung bei -20°C güns-

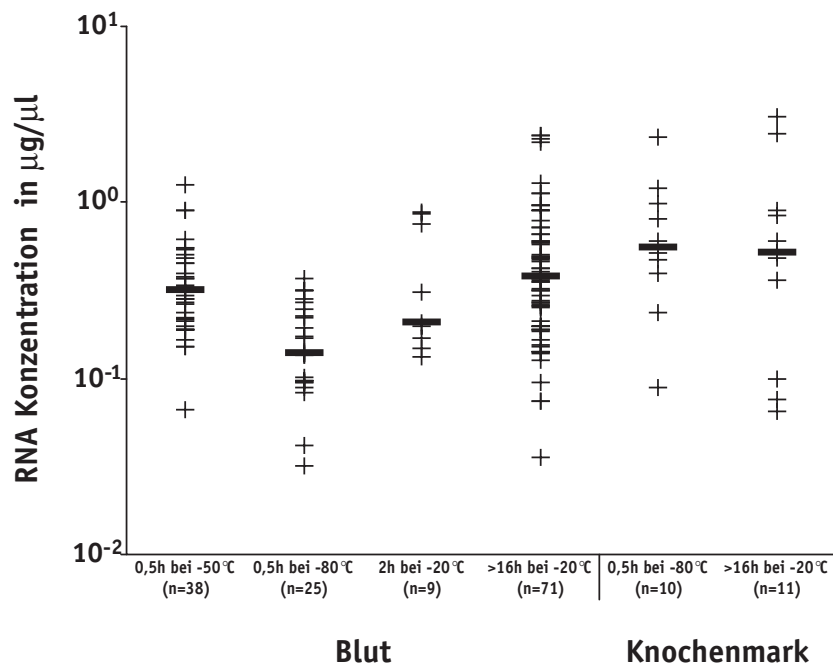


Abb 3.1 Einfluß der Dauer und der Temperatur der Isopropanolausfällung während der RNA-Isolierung auf die RNA-Ausbeute (Querstrich: Median).

tiger als bei -80°C ist, unter anderem wahrscheinlich auch dadurch, daß die Proben bei -80°C häufig gefroren waren. Die anfänglich aus technische Gründen bei -50°C ausgefällten Proben ergaben vergleichbare RNA-Konzentrationen zu den Erstgenannten. Für Knochenmark ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Ausfällungsbedingungen. Allerdings muß man hier berücksichtigen, daß zur RNA-Isolierung im Gegensatz zu Blut unterschiedliche Mengen Knochenmark je nach Verfügbarkeit eingesetzt wurden. Eine längere Ausfällungsdauer bei -20°C führte zu einer im Mittel höheren Ausbeute. Dieser Sachverhalt wurde im Rahmen einer Gegenüberstellung von jeweils 2 Blutproben von 9 Spendern nochmals getestet, indem die RNA einer Blutprobe für 2 Stunden und die der anderen für 16-24h ausgefällt wurde (Abb. 3.2). Neben der

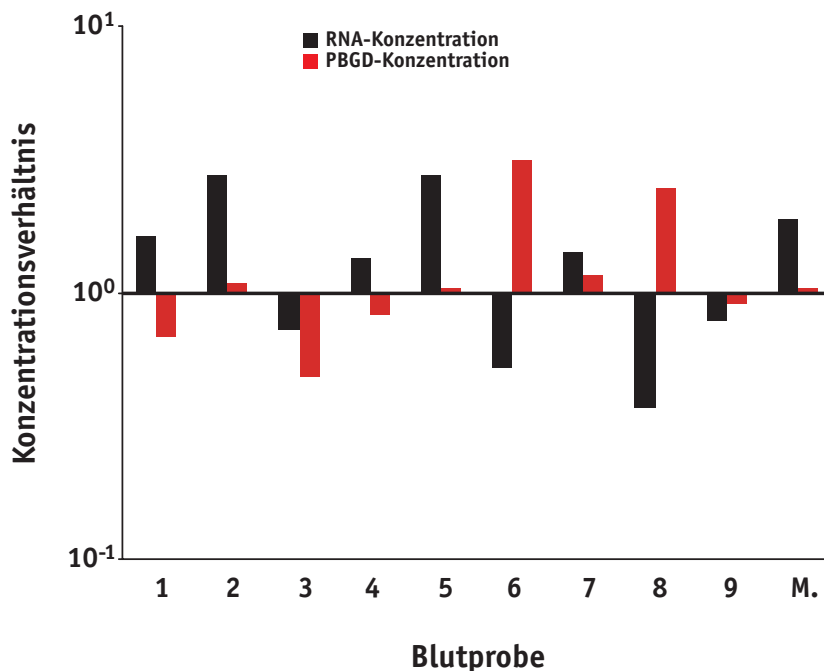


Abb 3.2 Verhältnis der RNA-Konzentrationen bzw. der PBGD-Transkripte (mit qRT-PCR gemessen) von jeweils zwei Blutproben eines Spenders, wobei die Isopropanolausfällung für die erste Probe (Zähler) für >16h und die der zweiten Probe (Nenner) für 2h bei -20°C erfolgte.

RNA-Konzentration wurde für diese Blutproben nach einheitlichen Bedingungen der cDNA-Synthese die PBGD-Konzentration mittels PCR bestimmt und miteinander verglichen. Die Unterschiede sind in beiden Fällen statistisch nicht signifikant, sodaß aus praktischen Gründen alle weiteren Blutproben für 16-24h bei -20°C ausgefällt wurden.

3.1.1.2 DNA-Verunreinigung

Die DNA-Reste in den RNA-Lösungen, die trotz Inkubation mit DNasen verbleiben, lassen sich mittels PBGD-PCR abschätzen. Die PBGD-DNA-Sequenz, die durch die hier verwendeten Primer definiert ist (Länge: 275bp), enthält lediglich ein kleines Intron von 87bp. Damit kann diese Sequenz mit unseren PCR-Bedingungen, die auf die Vervielfältigung der entsprechenden cDNA (Länge: 187pb) optimiert sind, ebenfalls vervielfältigt werden. Da jedoch die cDNA normalerweise in viel größerer Konzentration als die DNA-Reste in den Proben vorhanden ist, wird bei der PBGD-PCR aufgrund des exponentiellen Charakters des Reaktionsmecha-

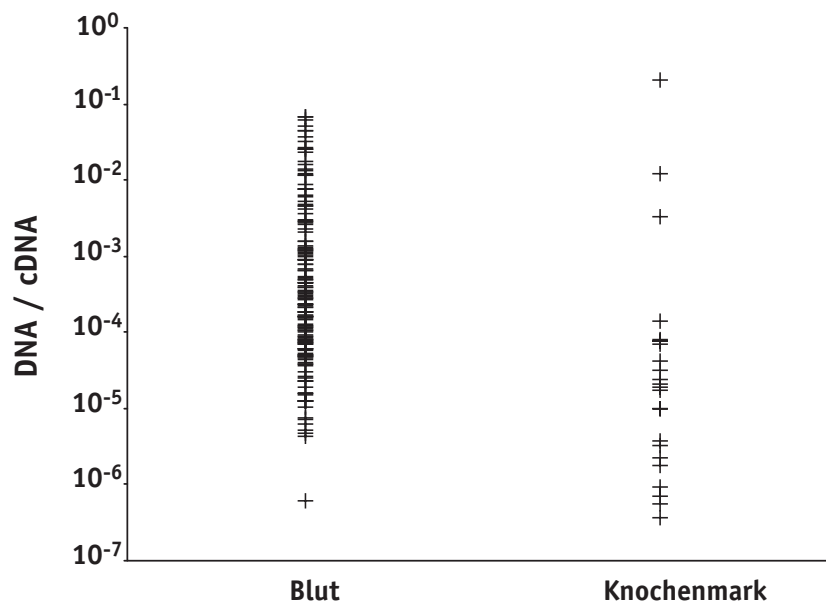


Abb 3.3 Verhältnis der DNA- zur cDNA-Konzentration in den aufgearbeiteten Proben abgeschätzt mittels quantitativer PBGD-PCR in normal bearbeiteten Proben, d.h. unter Verwendung der reversen Transkriptase in der cDNA-Synthese, und in den zugehörigen -RT-Proben.

nismus nur die entsprechende cDNA-Sequenz vervielfältigt. In den -RT-Proben dagegen ist keine cDNA, aber die gleiche Menge DNA wie in den normalen Proben enthalten. Hier wird bei der PBGD-PCR die entsprechende DNA-Sequenz amplifiziert. Abb. 3.3 zeigt das Verhältnis von PBGD-cDNA in den aufgearbeiteten Blut- und Knochenmarksproben zur DNA in den entsprechenden -RT-Kontrollen. Es wird ersichtlich, daß der Rest-DNA-Gehalt der Blutproben bis auf Ausnahmen mehrere Größenordnungen unter dem cDNA-Gehalt liegt und somit für PCR-Reaktionen für Marker wie PBGD, deren RNA-Kopien in ausreichender Anzahl in der

Zelle vorliegen, ohne Bedeutung ist. Für den Nachweis von Tumormarkern dagegen könnte der DNA-Gehalt von erheblicher Bedeutung werden, wenn cDNA- und DNA-Länge ähnlich sind, da die Anzahl der Tumormarker-RNA-Kopien eher klein ist. Es ist demnach von vordringlicher Bedeutung solche mRNA-Sequenzen zum Nachweis zu wählen, bei denen während des Processing ein ausreichend großes Intron ausgeschnitten wird (>1000bp).

3.1.2 cDNA-Synthese

3.1.2.1 RNA-Konzentration in der cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese mit dem Qiagen-Kit wird eine RNA-Menge von maximal 2µg pro Ansatz empfohlen. Um die Wahrscheinlichkeit des Nachweises eines seltenen Transkriptes zu erhöhen, wurde versucht, eine höhere RNA-Konzentration in der cDNA-Synthese zu verwenden: je nach RNA-Ausbeute zwischen 2 und 8 µg RNA pro Ansatz. In Vorversuchen von mit 10 oder 100 COLO205-Zellen gespickten Blutproben zeigten sich bei der Bestimmung des mRNA-Markers ProtM deutlich höhere absolute Werte bei ähnlichen relativen ProtM/PBGD-Verhältnis, wenn höhere RNA-Konzentrationen in der cDNA-Synthese eingesetzt wurden. Die Marker-Konzentrationen lagen in einem für die Quantifizierung günstigeren Bereich, so daß im weiteren bei allen doppelt vorhandenen Blutproben eine mit Standard-Bedingungen und die zweite mit konzentrierter RNA aufgearbeitet wurde. Die Effektivität der Konzentrierung wurde anhand der PBGD-Konzentration abgeschätzt (Abb. 3.4). Betrachtet man die PBGD-Konzentration pro µg eingesetzte RNA-Menge in der cDNA-Synthese so erhält man bei 278 Patientenblutproben einen Median von 18578 NSM, mit nur geringer Variation: 10% Perzentile = 9034 and 90% Perzentile = 41311. Der Median in Referenzblutproben war etwas geringer (15293 NSM, p=n.s.) wie auch der in Blutproben, die mit höherer RNA-Konzentration (Median: 5,1µg) verarbeitet wurden (Median: 16687 NSM, p=n.s.). Der Vergleich der absoluten PBGD Konzentration in cDNA-Proben zeigte einen Median für Patientenblutproben, die nach Standardprotokoll bzw. mit höherer RNA-Konzentration aufgearbeitet wurden von 38999 NSM bzw. 70198 NSM. Damit wurde für eine mittlere Erhöhung der RNA-Konzentration auf 255% eine im Mittel 1,8-fache Konzentrierung der Proben erreicht.

Die RNA-Ausbeute für Knochenmark war wesentlich höher als die für Blutproben, so daß in diesem Fall ein Teil des Knochemarks einer Probe standardisiert und der andere mit höherer RNA-Menge umgeschrieben werden konnte. Hier zeigte sich für die 10 Knochenmarksproben von Patienten eine mittlere PBGD- (G6PD-) Konzentration/µg RNA von 182879 (43579)

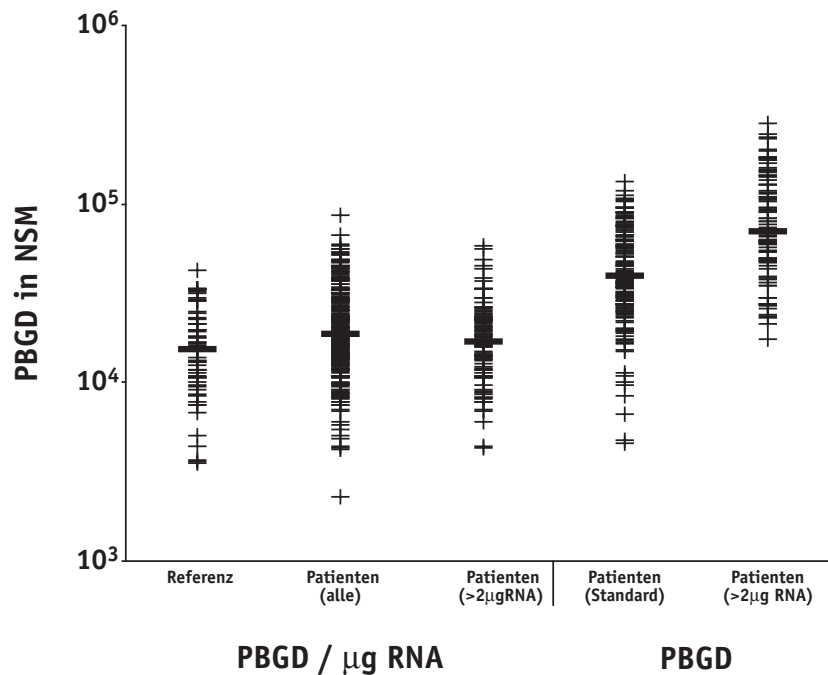


Abb 3.4 PBGD-Transkripte in Referenz- und Patientenblutproben, wobei die PBGD-Konzentration für die ersten drei Gruppen auf die in der cDNA-Synthese eingesetzte RNA-Menge normiert wurde und für die letzten beiden Gruppen in absoluter Größe dargestellt ist. Die 3. und 5. Gruppe enthält Messwerte, die mit höherer RNA-Konzentration in der cDNA-Synthese erhalten wurden (Querstrich: Median).

NSM für den Einsatz von 2µgRNA und 205309 (45271) NSM für höhere RNA-Mengen. Damit wurde für eine mittlere Erhöhung der RNA-Konzentration auf 356% eine im Mittel 4-fache (PBGD) bzw. 3,56-fache (G6PD) Konzentrierung der Proben erreicht. Da im Gegensatz zu Blut jeweils Teile einer einzigen Probe unterschiedlich aufgearbeitet wurden, können probenspezifische Unterschiede für Knochenmark ausgeschlossen werden. Für PBGD und G6PD wurde dabei eine 100%ige Effektivität der Konzentrierung erreicht.

3.1.2.2 Oligo-dT- versus random-hexamer-Primer in der cDNA-Synthese

Abb. 3.5 zeigt den Vergleich des Verhältnisses von Markerkonzentrationen für Proben, die in einem Ansatz mit oligo-dT und einem zweiten Ansatz mit random-hexamer-Primern in der cDNA-Synthese umgeschrieben wurden. Es ist offensichtlich, daß die Ausbeute für PBGD, ProtM und CEA wesentlich besser mit oligo-dT-Primern war. Für CK20 und WT1 sind die

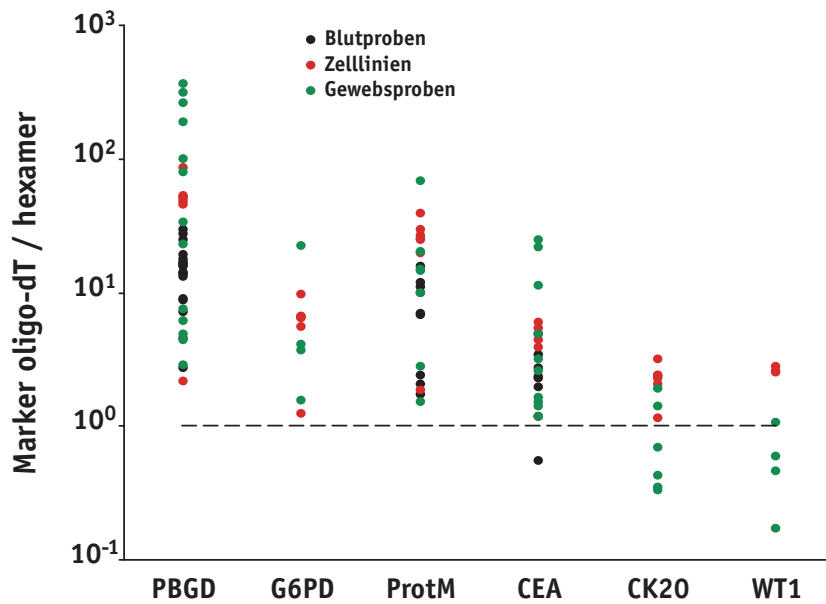


Abb 3.5 Verhältnis verschiedener Marker-Transkripte gemessen mit qRT-PCR in zwei Teilproben einer Blutprobe, Zelllinien- oder Gewebeprobe, die jeweils unter Verwendung unterschiedlicher Primer in der cDNA-Synthese hergestellt wurden.

Unterschiede weniger deutlich aber in der Mehrzahl zugunsten der oligo-dT-Primer, so daß standardmäßig alle weiteren Proben mit oligo-dT-Primer umgeschrieben wurden.

3.1.3 RT-PCR

3.1.3.1 Etablierung von PCR-Bedingungen

Für ProtM, CEA und CK20 wurden die PCR-Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert. Die Austestung beinhaltete folgende Schritte: Primer-Design mit der Oligo 6.1 Software, PCR-Lauf ohne Sonden unter verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen und Annealing-Temperaturen (Erfolgskontrolle durch Auftragung der PCR-Produkte auf Agarose-Gel), bei Erfolg: Sondendesign und -Bestellung durch MolBiol bzw. Metabion und Feinabstimmung der PCR-Bedingungen unter Berücksichtigung der Sonden. Alle ausgetesteten Primer sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tab 3.1 Sequenzen aller ausgetesteten Primer und Sonden. Alle geeigneten und für die Untersuchungen verwendeten Primer und Sonden sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Gen	Bez.	Sequenz	Amplifikat (bp)
PBGD	PBGDfw	5'-TGCAGGCTACCATCCATGTCCCTGC-3'	187
	PBGDrev	5'-AGCTGCCGTGCAACATCCAGGATGT-3'	
	Sonden	5'-LCRed-640-IGTGGGTCATCCTCAGGGCCATCTTC-Pho-3'	
	Sonden	5'-CGTGGAAATGTTACGAGCAGTGATGCCTACC-Fluo-3'	
G6PD	G6PDfw	5'-CCGCATCGACCACTACCTGGGCAAG-3'	343
	G6PDre	5'-GTTCCCCACGTA CTGGCCCAGGACCA-3'	
	Sonden	5'-LCRed-640-CAAATCTCAGCACCATGAGGTTCTGCAC-Pho-3'	
	Sonden	5'-GTTCCAGATGGGGCCGAAGATCCTGTTG-Fluo-3'	
ProtM	ProtM-1fw	5'-GGGCTGTGATCCACCCTGACTATG-3'	237
	ProtM-1rev	5'-GCTCACACTCCTCACGGGACAC-3'	
	ProtM-2fw	5'-CCAGCCAAACTCTCTGAACTCAT-3'	147
	ProtM-2rev	5'-CACCAGGTGGATGTATGCACACT-3'	
	ProtM-3fw	5'-ACTATGATGCCGCCAGCC-3'	232
	ProtM-3rev	5'-CCAGGGTAGGCATGCTCAC-3'	
	ProtM-4fw	5'-CCCAGCCAAACTCTCTGAA-3'	152
	ProtM-4rev	5'-GGGACACCAGGTGGATGTA-3'	
	ProtM-5fw	5'-GGTGGTGCTGAGTCTGATTGC-3'	199
	ProtM-5rev	5'-GAAGACCTGAAGATTCGGTTT-3'	
	ProtM-6fw	5'-CTACCAAGCTGCCCTCTACAC-3'	202
	ProtM-6rev	5'-GGCGGCATCATAGTCA-3'	
	ProtM-7fw	5'-GGCGGACCCTGCGACAAGA-3'	440
	ProtM-7rev	5'-GCATGCTCACACTCCTCACGGGAC-3'	
	ProtM-8fw	5'-GGACCCACAGTGGATGGATA-3'	161
	ProtM-8rev	5'-GATGGTGGTGCTGAGTCTGAT-3'	
	ProtM-9fw	5'-GAGTGTGAGCATGCCTACCCT-3'	237
	ProtM-9rev	5'-CACTTGGCCTGAATGGTT-3'	
	Sonden	5'-LCRed-640-GCTGGTGGTGTGGCTGAGCAGTCCCCTCTC-Pho-3'	
	Sonden	5'-TGTCTTGCCCCAGCCCAGGATGTGGC-Fluo-3'	

Gen	Bez.	Sequenz	Amplifikat (bp)
CEA	CEA-A	5'-TCTGGAACCTCTCCTGGTCTCTCAGCTGG-3'	160
	CEA-B	5'-TGTAGCTGTTGCAAATGCTTTAAGGAAGAAGC-3'	
	CEA-1fw	5'-GGCCGCAATAATTCCATAGTCAAG-3'	279
	CEA-1rev	5'-GATGTTGGCTAGGATGGTCTCGAT-3'	
	CEA-2fw	5'-CATTTCAGGAAGACTGACAGTTGT-3'	145
	CEA-2rev	5'-GGGTTTGATGTTGGCTAGGAT-3'	
	CEA-Zfw	5'-TGTCTCTAACTTGGCTACTGG-3'	301
	CEA-Zrev	5'-CACGATGTTGGCTAGGATGGT-3'	
	Sonden	5'-LCRed-640-CCAGCACTCCAATCATGATGCCGACAGTG-Pho-3'	
Sonden	5'-ACACCAGGGCTGCTATATCAGAGCAACCCCA-Fluo-3'		
CK20	CK20-1fw	5'-ATCAAGCAGTGGTACGAA-3'	125
	CK20-1rev	5'-AGGACACACCGAGCATT-3'	
	CK20-2fw	5'-GCAAATCAAGCAGTGGTACGAAAC-3'	136
	CK20-2rev	5'-AATTTGCAGGACACACCGAGCATT-3'	
	Sonden	5'-LCRed-640-CGAAGTCAGATTAAGGATGCTCAACTG-Pho-3'	
	Sonden	5'-CAGTGCATATTACAGACAAATTGAAGAGCT-Fluo-3'	
WT1	WT1fw	5'-CGCAATCAGGGTTACAGCA-3'	226
	WT1rev	5'-GCGTCCTCAGCAGCAAAG-3'	
	Sonden	5'-LCRed-640-TCTATGGCTGCCACACCCCCACCG-Pho-3'	
	Sonden	5'-CAGCAGTACTCGGTGCCGCCCC-Fluo-3'	
A33	A33fw	5'-CGGGTTACTACATCTGTACCT-3'	300
	A33rev	5'-GCTCTTCTTGCCCTGTAGTCAT-3'	
	Sonden	5'-LCRed-640-CCACCGTGATGTTGCAGAACTGC-Pho-3'	
	Sonden	5'-CCACGTTTCATGGAGGGAGATCTGAC-Fluo-3'	
RegIV	RegIVfw	5'-CCGAGCTCGAGTGTGAGTC-3'	270
	RegIVrev	5'-CTCCAAGTAAAAAGTTGTTATTG-3'	
	Sonden	5'-LCRed-640-CCTGCACGACCCACAGAAGAGG-Pho-3'	
	Sonden	5'-TATCAGAGAAGCCAGCCGATATGGATT-Fluo-3'	

Für ProteaseM existierte bereits eine etablierte PCR in der „nested“-Variante (Primer: ProtM-3,-4), die für den Nachweis des Markers in Gewebe und Zelllinien gut geeignet war, jedoch in Blutproben unspezifische Banden zeigte. Die letztlich ausgewählten Primer liegen in einem ähnlichen DNA-Bereich wie die vorher genannten. Es wurden zudem zwei Primer-Paare optimiert, um neben einer einfachen PCR eine „nested“-PCR zu testen. Für CEA wurden neben den bereits von Gerhard (1994) veröffentlichten Primern zwei neue Paare getestet, die leider keine Vorteile gegenüber den ersteren zeigten. Das Problem der CEA-PCR lag im Kurven-Verlauf des hinteren Bereichs (38-42 Zyklen) sowie im Auftreten von unspezifischen Banden im Agarose-Gel. Durch Feinabstimmung der PCR-Bedingungen (Erhöhung der Annealing-Temperatur sowie Verlängerung der Denaturierungszeit) konnten beide Probleme beseitigt werden. Für CK20 wurden zwei Primerpaare für den Anfangsteil der mRNA-Sequenz getestet. Für PBGD, G6PD, WT1, CCSG und A33 wurden die bereits durch Labormitarbeiter etablierten PCR-Bedingungen sowie die entsprechenden Standards verwendet.

Abb. 3.6 – 3.14 zeigen PCR-Kurven für die getesteten Marker. Neben Standardverdünnungsreihen sind Kurven von Referenz-Blut- und –Knochenmarksproben dargestellt.

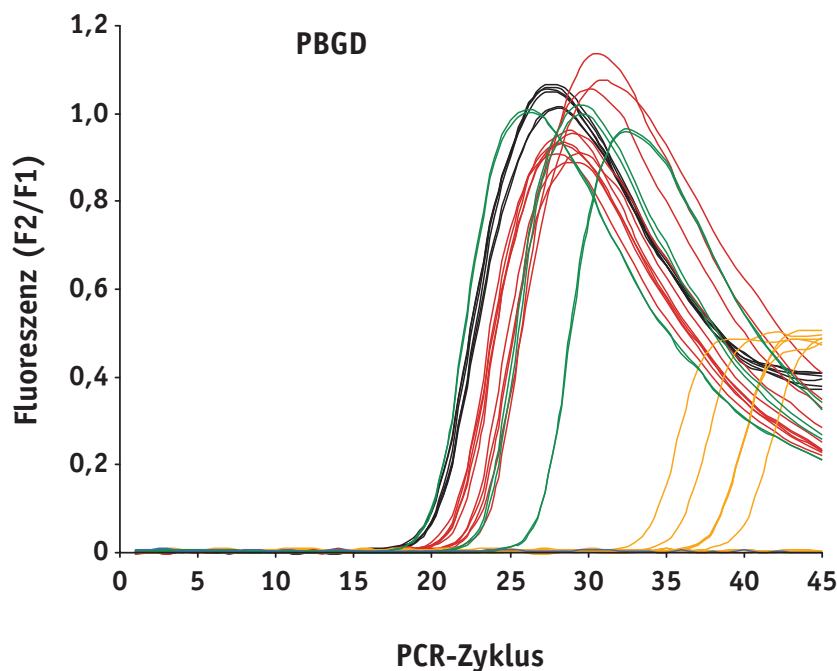


Abb 3.6 Amplifikation von PBGD-Transkripten in normalen Blut- (—) und Knochenmarksproben (—), der entsprechenden Sequenz in Standards verschiedener Konzentrationen (—) und in der DNA von Blutproben (-RT-Kontrollen)(—). Die Wasserkontrolle ist blau dargestellt.

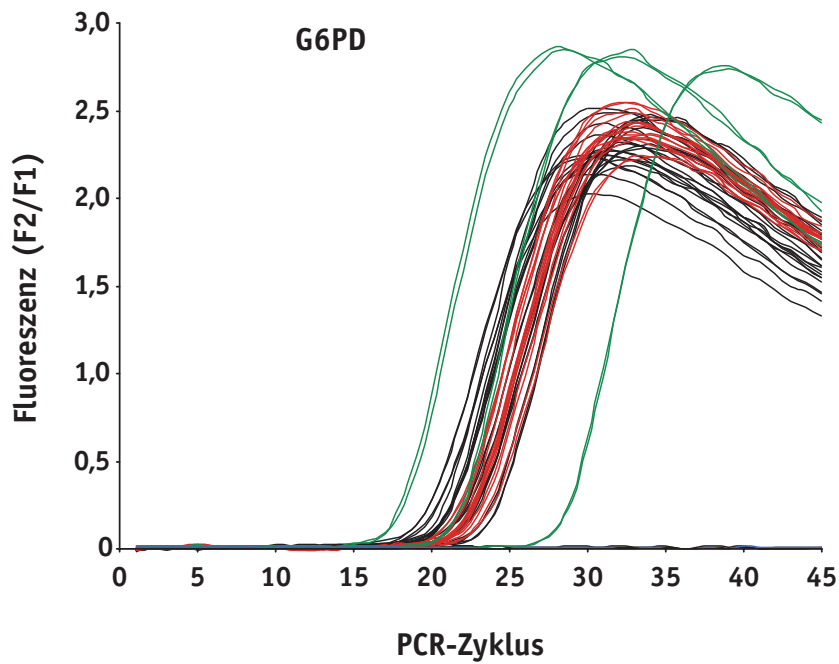


Abb 3.7 Amplifikation von G6PD-Transkripten in normalen Blut- (—) und Knochenmarksproben (—) und der entsprechenden Sequenz in Standards verschiedener Konzentrationen (—).

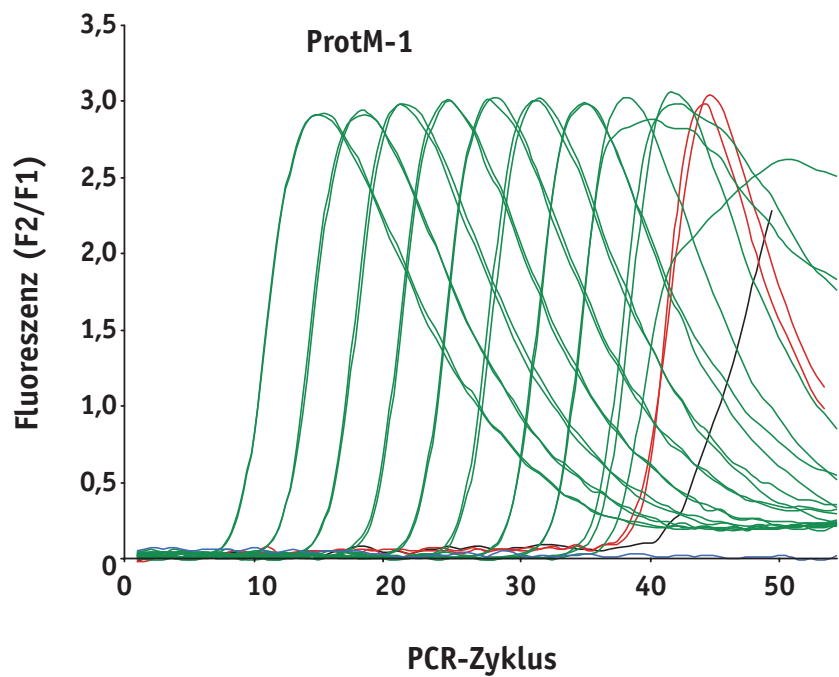


Abb 3.8 Amplifikation von ProtM1-Transkripten in normalen Blut- (—) und Knochenmarksproben (—) und der entsprechenden Sequenz in Standards verschiedener Konzentrationen (—).

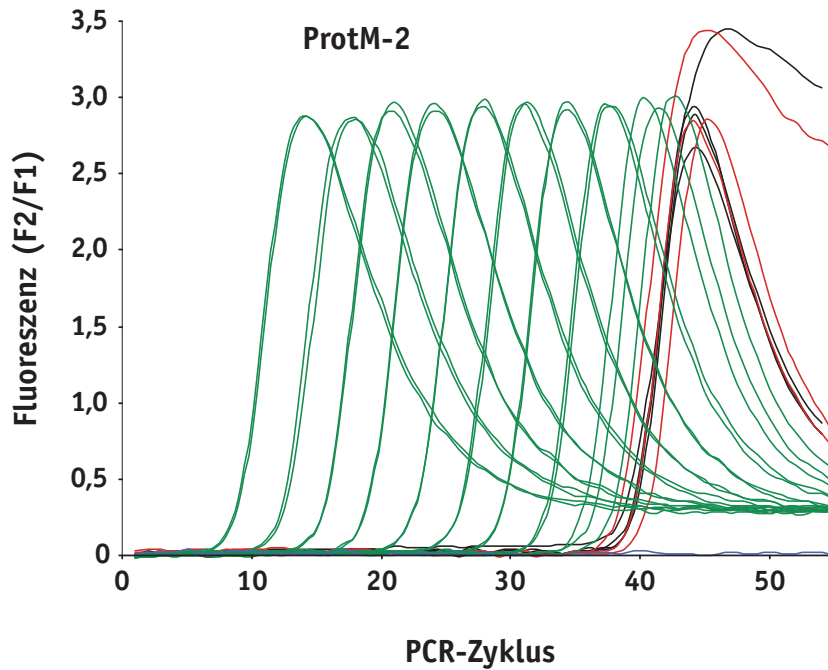


Abb 3.9 Amplifikation von ProtM2-Transkripten in normalen Blut- (—) und Knochenmarksproben (—) und der entsprechenden Sequenz in Standards verschiedener Konzentrationen (—).

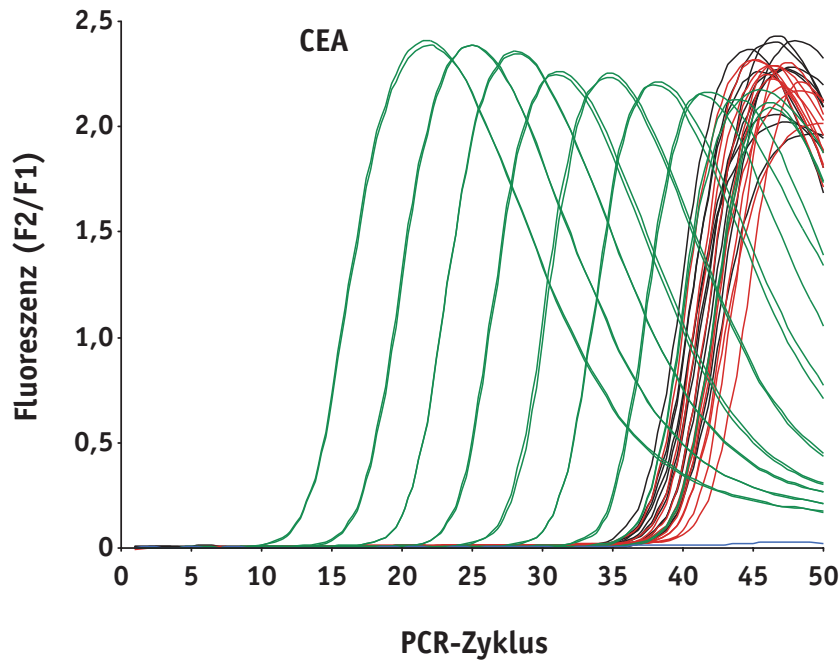


Abb 3.10 Amplifikation von CEA-Transkripten in normalen Blut- (—) und Knochenmarksproben (—) und der entsprechenden Sequenz in Standards verschiedener Konzentrationen (—).

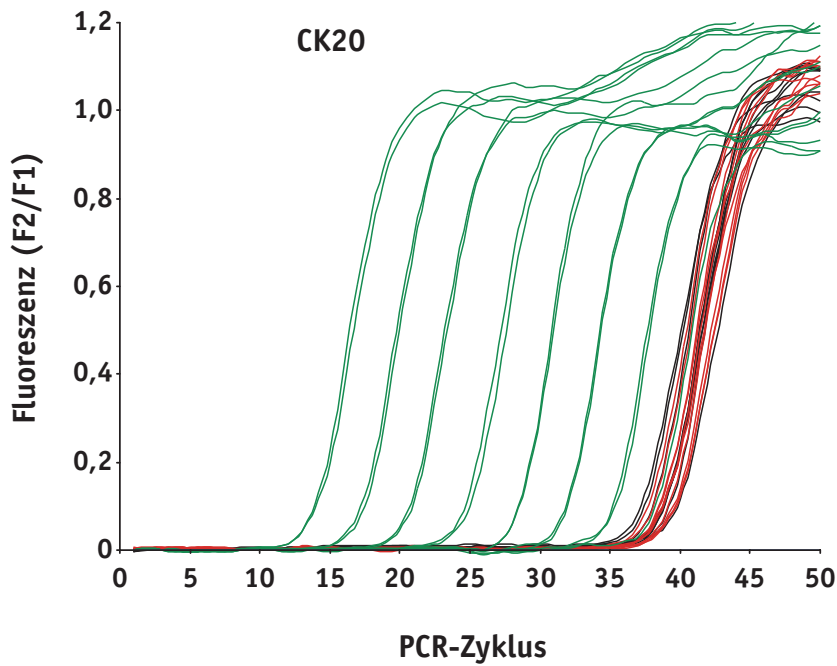


Abb 3.11 Amplifikation von CK20-Transkripten in normalen Blut- (—) und Knochenmarksproben (—) und der entsprechenden Sequenz in Standards verschiedener Konzentrationen (—).

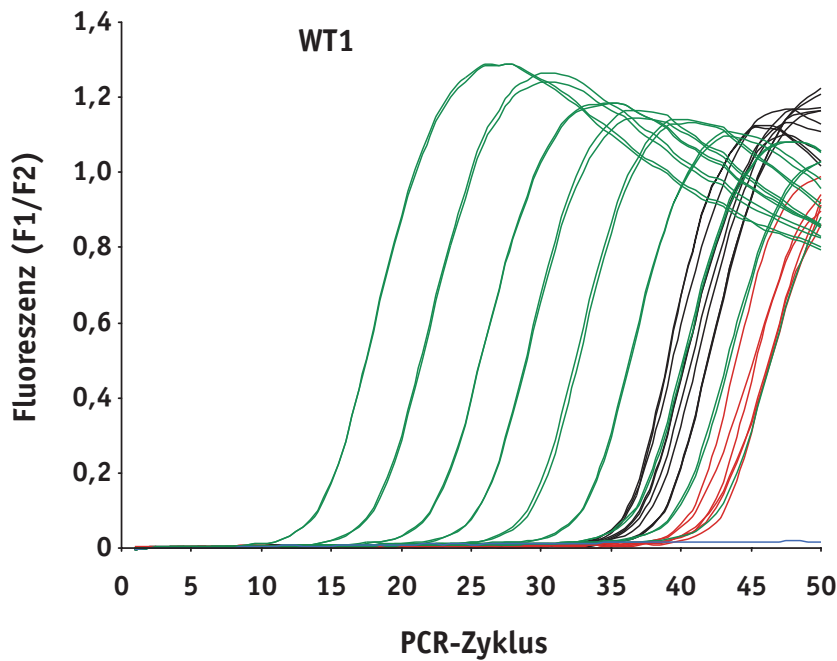


Abb 3.12 Amplifikation von WT1-Transkripten in normalen Blut- (—) und Knochenmarksproben (—) und der entsprechenden Sequenz in Standards verschiedener Konzentrationen (—).

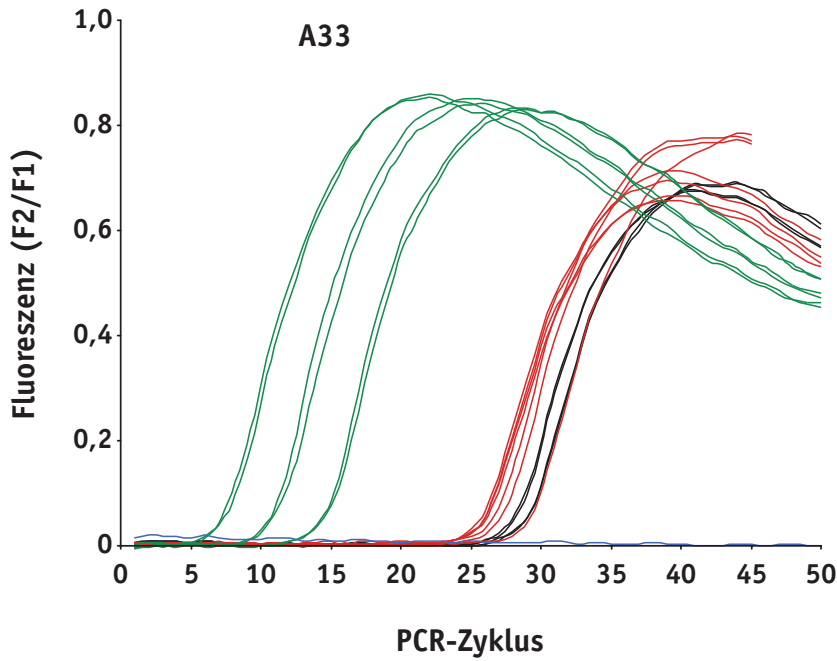


Abb 3.13 Amplifikation von A33-Transkripten in normalen Blut- (—) und Knochenmarksproben (—) und der entsprechenden Sequenz in Standards verschiedener Konzentrationen (—).

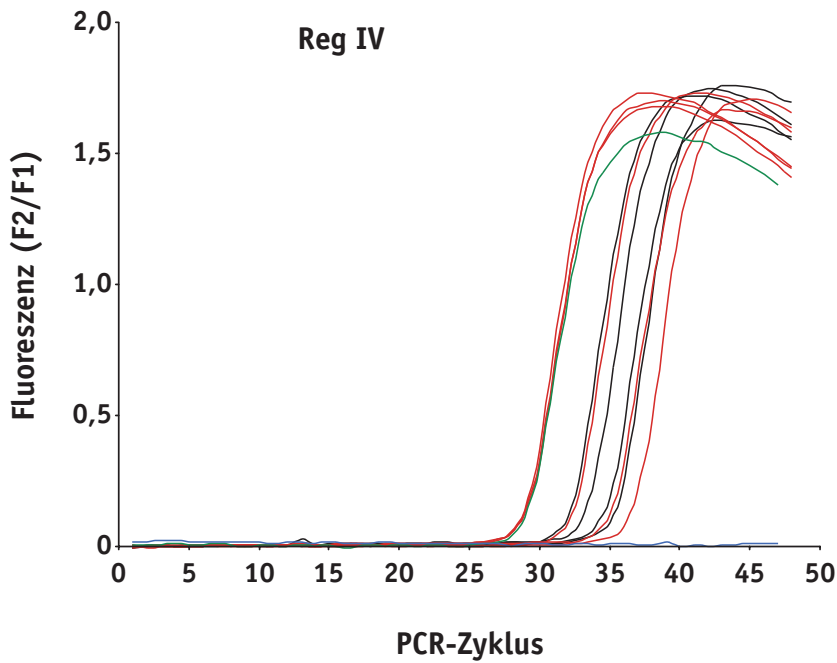


Abb 3.14 Amplifikation von RegIV-Transkripten in normalen Blut- (—) und Knochenmarksproben (—) und der entsprechenden Sequenz in Standards verschiedener Konzentrationen (—).

Für ProM, CEA, WT1 und CK20 (Abb. 3.8 – 3.12) liegen die Kurven für Referenz-Blut- und –Knochenmarksproben im hinteren Bereich bei 37-40 Zyklen und demnach bei entsprechen weniger als 100 Standard-Kopien. RegIV und A33 (Abb. 3.13, 3.14) können in wesentlich höherer Kopien-Anzahl in Referenz-Proben nachgewiesen werden, so daß diese Marker nicht geeignet für den Nachweis von seltenen, aus Tumorzellen stammenden Transkripten sind. Beide Marker wurden deshalb im Folgenden nicht weiter verwendet. Abb. 3.15 – 3.24 zeigen die Banden spezifischer PCR-Produkte für die genannten Marker nach Auftragen auf ein 1,5%iges Agarose-Gel. Die PCR-Bedingungen für alle genannten Marker sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2 PCR-Bedingungen und LightCycler-Einstellungen.

Marker	MgCl ₂ (mM)	Zykl.	1. Segment		2. Segment		3. Segment		Fluoreszenz		
			T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)	F1	F2	F3
PBGD	4	45	95	0	65	12	72	10	1	15	30
G6PD	4	40	95	0	65	12	72	15	1	15	30
ProtM-1	4	50	95	0	68	12	72	10	1	50	30
ProtM-2	4	50	95	0	67	12	72	10	1	50	30
CEA	4	50	95	10	65	12	72	6	1	15	30
CK20	5	50	95	10	65	10	72	5	1	15	30
WT1	2	50	95	0	65	12	72	10	1	15	30
A33	5	50	95	0	65	12	72	15	1	15	30
RegIV	4	50	95	0	60	12	72	10	1	15	30

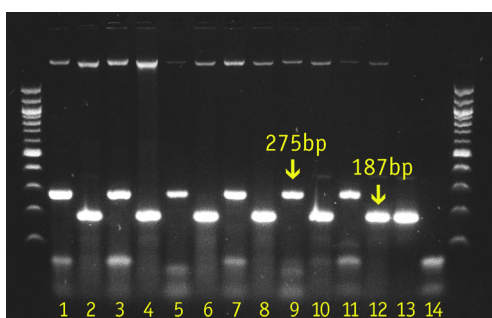


Abb 3.15 PBGD: Blutproben (2,4), Knochenmarksproben (6,8), Gewebe (10,12), entsprechende -RT-Proben (1,3,5,7,9,11), Standard (13), Wasserkontrolle (14).

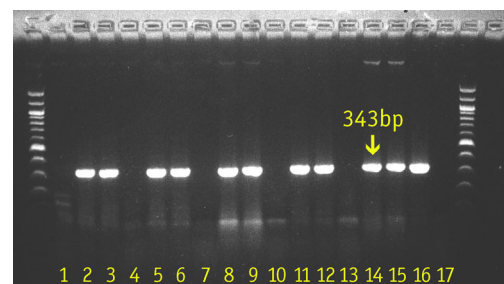


Abb 3.16 G6PD: Blutproben (2,3,5,6), Knochenmarksproben (8,9), Zelllinie (11,12), Gewebe (14,15), entsprechende -RT-Proben (1,4,7,10,13), Standard (16), Wasserkontrolle (17).

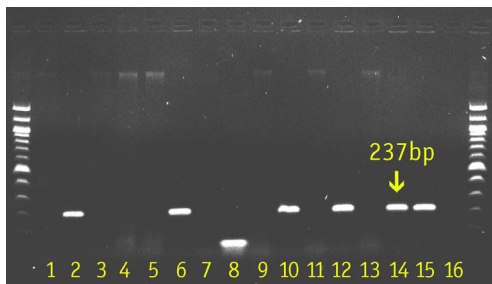


Abb 3.17 ProtM-1: Blutproben (2,4), Knochenmarksproben (6,8), Zelllinie (10), Gewebe (12,14), entsprechende -RT-Proben (1,3,5,7,9,11,13), Standard (15), Wasserkontrolle (16).

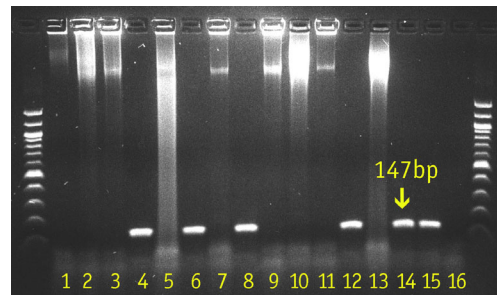


Abb 3.18 ProtM-2: Blutproben (2,4,6), Knochenmarksproben (8,10), Zelllinie (12,14), entsprechende -RT-Proben (1,3,5,7,9,11,13), Standard (15), Wasserkontrolle (16).

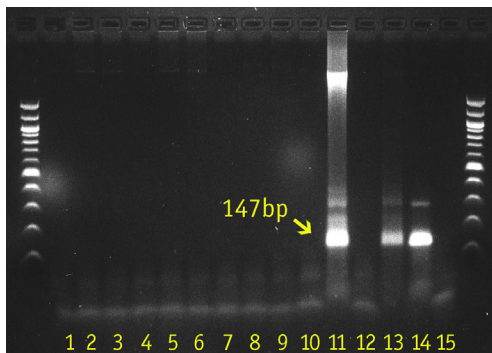


Abb 3.19 ProtM-nest: Blutproben (2,4,6), Knochenmarksproben (8,9), Zelllinie (11), Gewebe (13), entsprechende -RT-Proben (1,3,5,7,10,12), Standard (14), Wasserkontrolle (15).

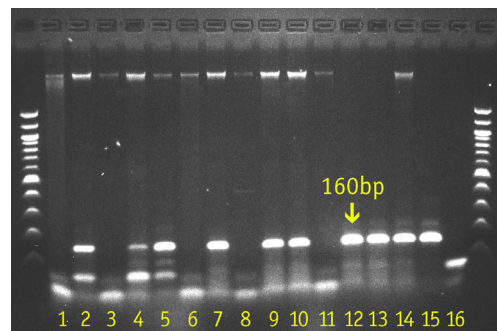


Abb 3.20 CEA: Blutproben (2,4,5), Knochenmarksproben (7,9,10), Zelllinie (12,13), Gewebe (14), entsprechende -RT-Proben (1,3,6,8,11), Standard (15), Wasserkontrolle (16).

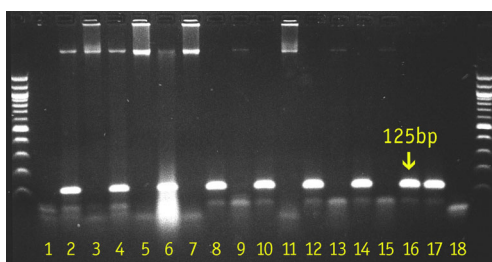


Abb 3.21 CK20: Blutproben (2,4,6), Knochenmarksproben (8,10,12), Zelllinie (14), Gewebe (16), entsprechende -RT-Proben (1,3,5,7,9,11,13,15), Standard (17), Wasserkontrolle (18).

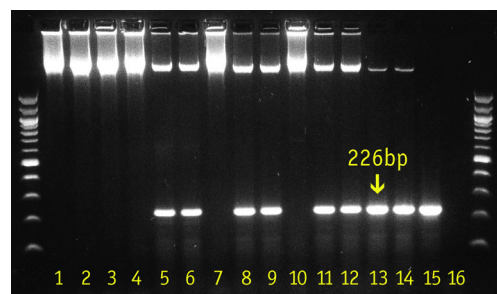


Abb 3.22 WT1: Blutproben (2,3,5,6), Knochenmarksproben (8,9,11,12), Zelllinie (13,14), entsprechende -RT-Proben (1,4,7,10), Standard (15), Wasserkontrolle (16).

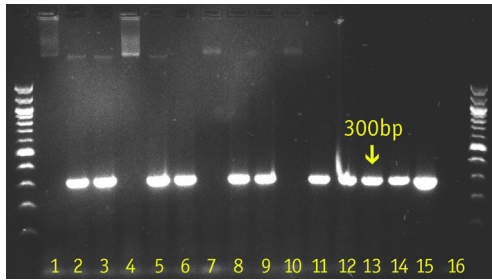


Abb 3.23 A33: Blutproben (2,3,5,6), Knochenmarksproben (8,9,11,12), Zelllinie (13,14), entsprechende -RT-Proben (1,4,7,10), Standard (15), Wasserkontrolle (16).

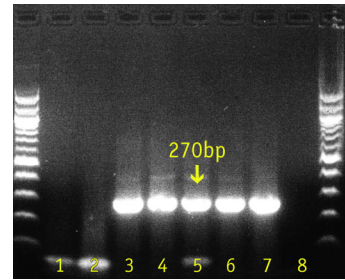


Abb 3.24 RegIV: Blutproben (3,4), Knochenmarksproben (5,6), Zelllinie (7), entsprechende -RT-Proben (1,2), Wasserkontrolle (8).

3.1.3.2 »Single-round« versus »nested« PCR

Im folgenden wurden die Sensitivitäten der ProtM-PCR mit dem äußeren Primer (ProtM-1), dem inneren Primer (ProtM-2) und der ineinandergeschachtelten Form unter Zuhilfenahme

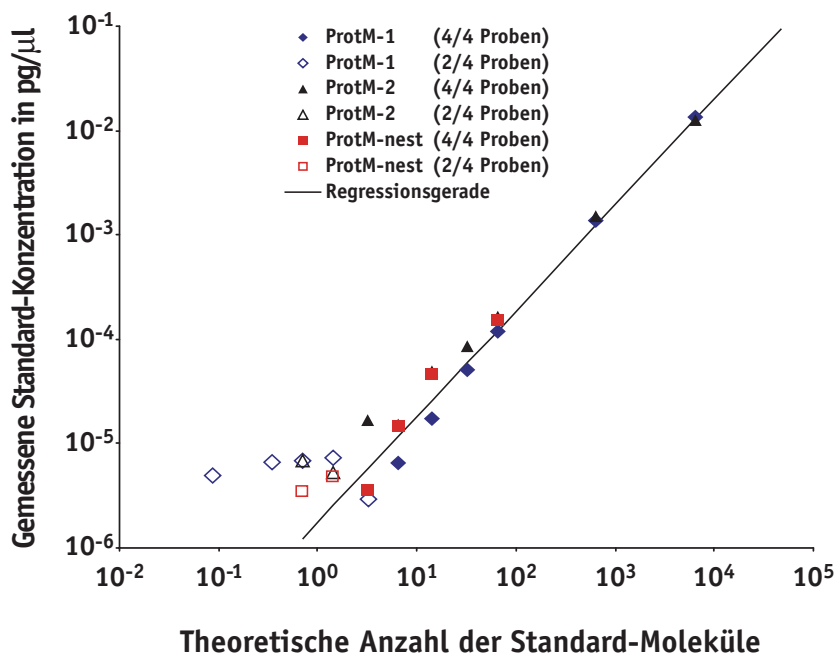


Abb 3.25 Gemessene ProtM-Standard-Konzentrationen von Standardverdünnungsreihen mittels qRT-PCR unter Verwendung der Primer ProtM-1, ProtM-2 oder der „nested“-Variante aus ProtM-1 und -2. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 4 Messungen. Im Falle der offenen Symbole wurden nur in 2 von 4 Fällen Amplifikate detektiert.

einer Standard-Verdünnungsreihe getestet. Dabei zeigte sich, daß unter den angegebenen Bedingungen die PCR mit dem inneren Primer am sensitivsten war und die der „nested“-PCR im Bereich der des äußeren Primers lag (Abb. 3.25). Die einfache PCR mit dem LightCycler ist folglich bei optimierten PCR-Bedingungen ebenso sensitiv wie eine „nested“ PCR ohne deren Nachteile (höherer Aufwand, Verunreinigungsgefahr) zu besitzen.

3.1.3.3 Quantitativer Bereich der PCR für ProtM, CEA, CK20 und WT1

In Abb. 3.26 sind die theoretischen und gemessenen Werte von Standard-Verdünnungen für die genannten Marker gegeneinander aufgetragen (Mittelwerte aus 2-4 Messungen). Für alle Marker ist eine genaue Quantifizierung bis zu einer Standard-Konzentration von 10 Molekülen im Ansatz über einen Breich von 8 Zehnerpotenzen gewährleistet. Der Nachweis von bis zu einem Molekül/Ansatz ist möglich, jedoch nicht in quantitativer Weise.

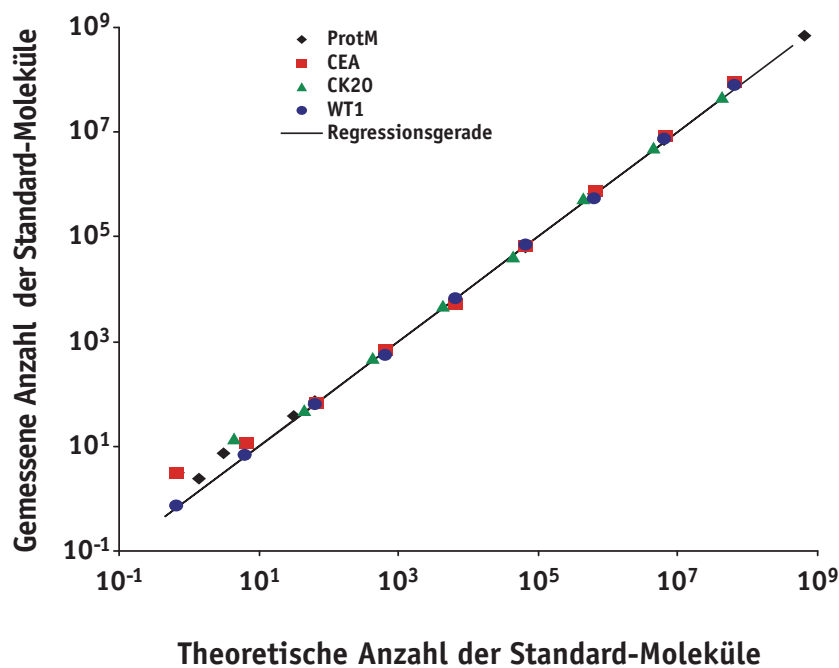


Abb 3.26 Gemessene Standard-Konzentrationen von Standardverdünnungsreihen verschiedener Marker mittels qRT-PCR.

Die relative Standardabweichung (Standardabweichung/Mittelwert) für gleiche Proben innerhalb eines PCR-Laufes ist beispielhaft anhand der Standard-Verdünnungskurven in Abb. 3.27 dargestellt und beträgt im Mittel 10%. Für gleiche Proben, deren Konzentrationen in 15 verschiedenen Läufen bestimmt wurden, beträgt die relative Standard-Abweichung weniger als 10%.

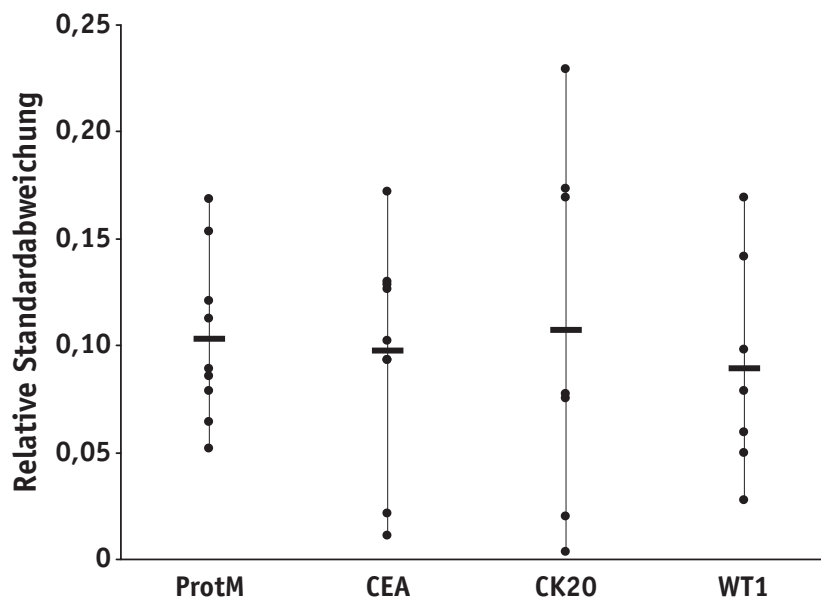


Abb 3.27 Relative Standardabweichung für jeweils 4 Wiederholungsmessungen innerhalb eines PCR-Laufes für verschiedene Marker (Datenpunkte). Die Querstriche repräsentieren den Mittelwert der relativen Standardabweichungen.

3.1.5 Expression von Haushaltsgenen

Abb. 3.28 zeigt die Verteilung der G6PD und PBGD-Werte normiert auf die eingesetzte RNA-Menge für die Referenzpopulation und die Patientenblutproben. Während die PBGD-Konzentration maximal um den Faktor 50 schwankt, umfaßt der Bereich der G6PD-Konzentrationen mehrere Größenordnungen. Desweiteren wird deutlich, daß die PBGD-Werte im Knochenmark etwa eine Größenordnung über denen des Blutes liegen, was durch die Aktivität des Isoenzym während der Erythropoese zu erklären ist und damit die Tauglichkeit von PBGD als HKG im Knochenmark fraglich erscheinen läßt. Nichtsdesdotrotz schwanken auch für Knochenmark die PBGD-Werte weniger als die G6PD-Werte. Im Blut wiederum scheint G6PD ungeeignet als HKG zu sein aufgrund der starker Schwankungen. Desweiteren wurden in Abb. 3.29 und 3.30 die PBGD- und G6PD-Werte gleicher Blut- bzw. Knochenmarksproben gegeneinander aufgetragen. Es ergaben sich folgende Korrelationskoeffizienten: Referenz-Blutproben: 0,23, Patienten-Blutproben: 0,04, Referenz-Knochenmark: 0,20, Patienten-Knochenmark: 0,71.

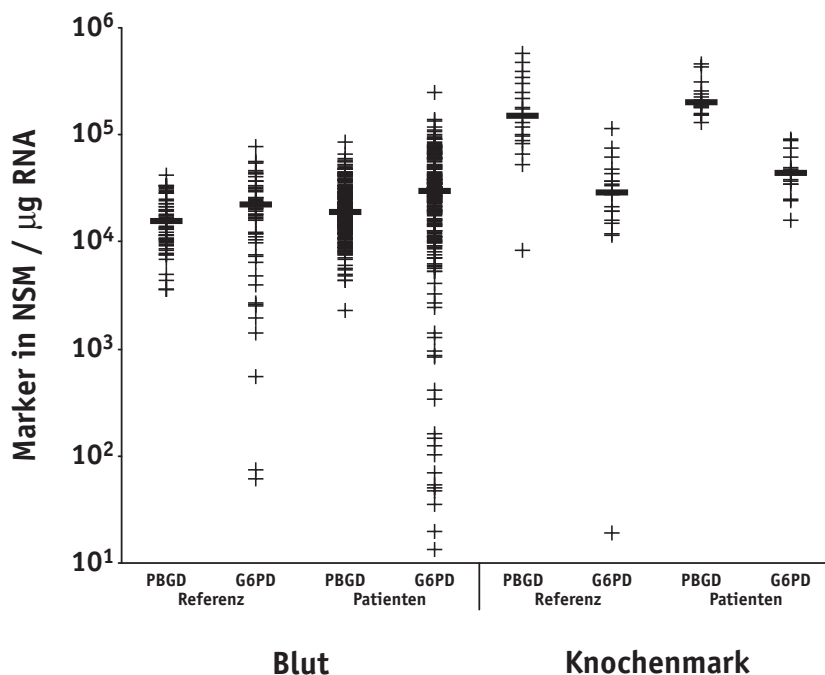


Abb 3.28 PBGD- und G6PD-Konzentrationen pro µg eingesetzter RNA-Menge in der cDNA-Synthese für Referenz- und Patientenblut- bzw. Knochenmarksproben (Querstrich: Median).

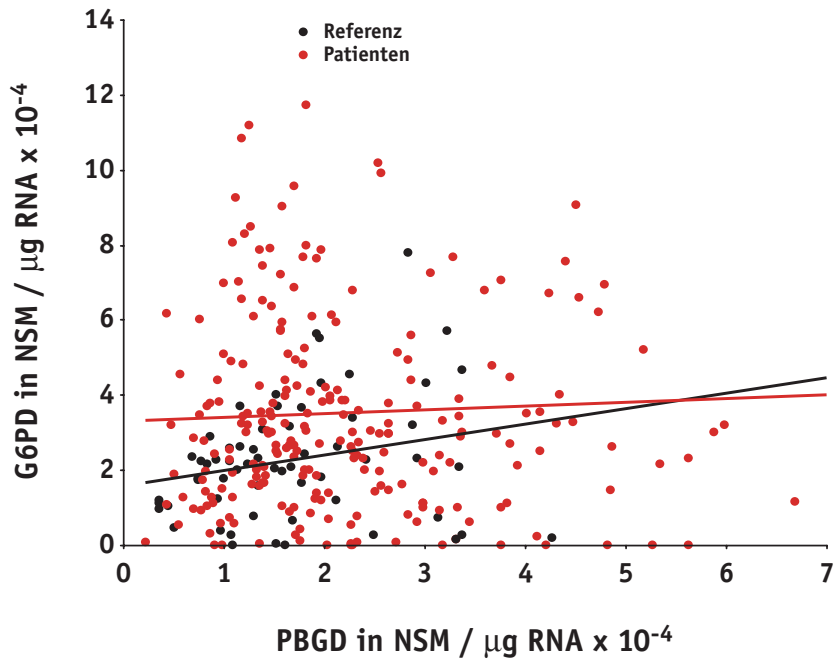


Abb 3.29 Auftragung der G6PD- gegenüber der PBGD-Konzentration der untersuchten Blutproben inklusive der berechneten Regressionsgeraden.

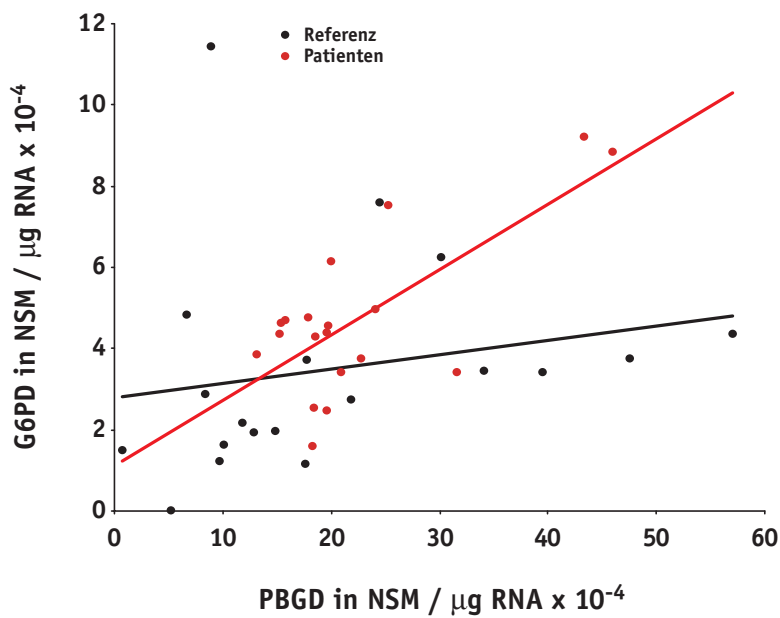


Abb 3.30 Auftragung der G6PD- gegenüber der PBGD-Konzentration der untersuchten Knochenmarksproben inklusive der berechneten Regressionsgeraden.

3.2 Expression von ProtM, CEA, CK20 und WT1 in Zelllinien und Gewebe

ProtM, CEA und CK20 waren in allen untersuchten und WT1 nur in drei Zelllinien nachweisbar (Abb. 3.31). Das Expressions-Niveau der entsprechenden mRNA variierte über fünf (CEA) bzw. drei (ProtM, CK20, WT1) Größenordnungen, wobei die mittlere Expression mit einem Marker/PBGD-Verhältnis von 2,6 für ProtM am größten war und zwei Größenordnungen über denen von CEA (0,055), CK20 (0,02) und WT1 (0,036) lag.

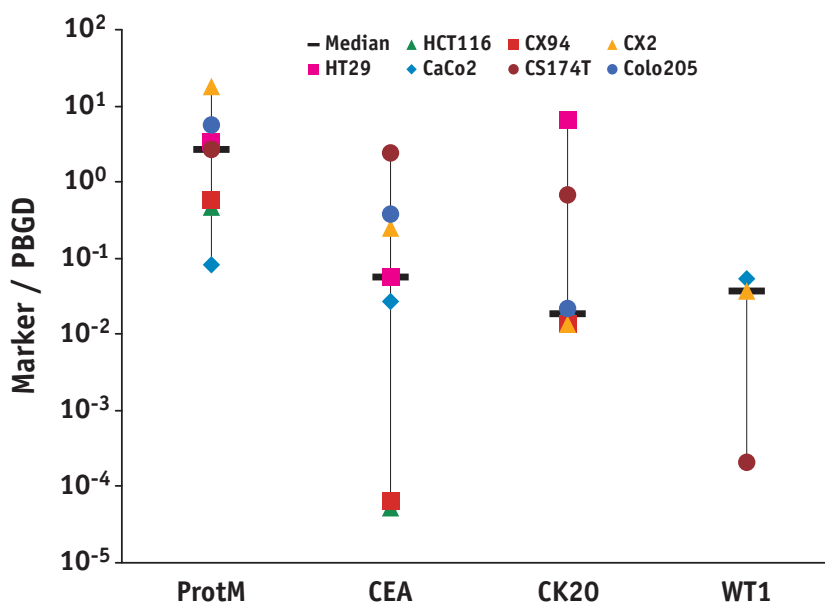


Abb 3.31 Darstellung des Marker/PBGD-Verhältnisses (jeweils in NSM) für verschiedene Marker in Kolonkarzinomzelllinien (Querstrich: Median).

Während CEA und CK20 in allen Gewebeproben nachgewiesen konnte, waren für ProtM und WT1 jeweils 2 der 4 untersuchten normalen Mukosa-Proben negativ (Abb. 3.32). Eines der untersuchten Kolon-Karzinom-Gewebe war negativ für ProtM und zeigte deutlich niedrigere Expressionsniveaus für die anderen Marker. WT1 konnte nur in 10 von 15 Kolon-Karzinom-Geweben nachgewiesen werden. Das mittlere Expressionsniveau war am größten für CEA mit einem Marker/PBGD-Verhältnis von 330, gefolgt von CK20 (73) und mehrere Größenordnungen darunter von ProtM (0,12) und WT1 (0,01). Die Expression im Normalgewebe entsprach für CEA und CK20 in etwa der des Tumorgewebes, während die von ProtM und WT1 deutlich geringer war.

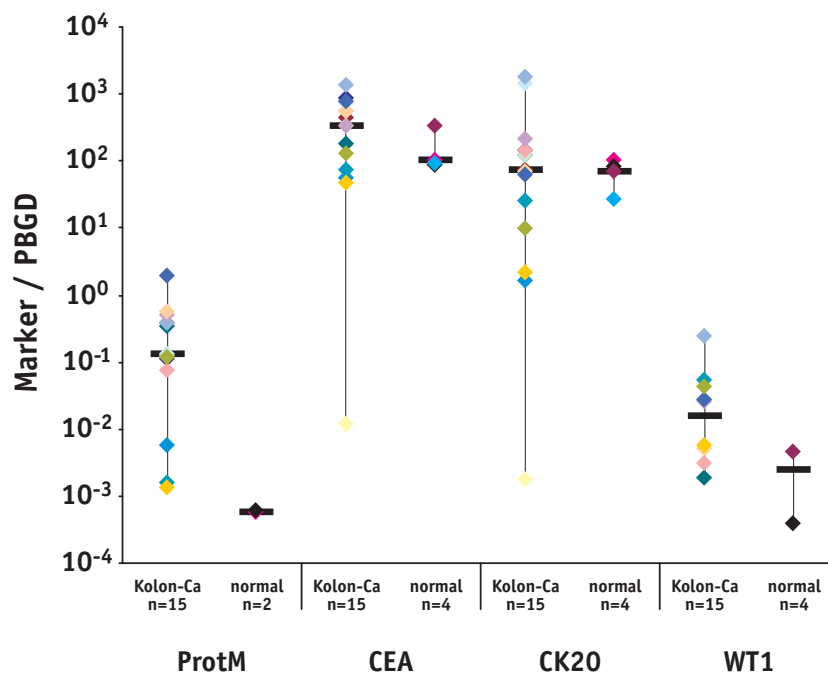


Abb 3.32 Darstellung des Marker/PBGD-Verhältnisses (jeweils in NSM) für verschiedene Marker in Gewebeproben von Kolonkarzinomen bzw. normaler Mukosa (Querstrich: Median).

3.3 Nachweis von Tumormarkern im Blut

3.3.1 Expression von ProtM, CEA, CK20 und WT1 in Blutproben von gesunden Spendern

In 22,5%, 83,7%, 84,6% und 22,7% der Gesundblutproben waren ProtM-, CEA-, CK20- und WT1-mRNA nachweisbar mit einem maximalen Marker/PBGD-Verhältnis von $8,5 \times 10^{-5}$, 81×10^{-5} , 59×10^{-5} bzw. 42×10^{-5} . Aufgrund dieser Basis-Expression im Blut von gesunden Spendern mußten für den Nachweis von Tumorzellen untere Grenzwerte festgelegt werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Strategie I beinhaltet, daß der Nachweis von ProtM- und WT1-mRNA nur als positiv gewertet wurde, wenn das Doppelte des Maximalwertes von Gesundblut überschritten war, d.h. ein Marker/PBGD-Verhältnis von 17×10^{-5} (ProtM) bzw. von 84×10^{-5} (WT1). Für CEA und CK20 war der Prozentsatz der positiven Gesundblutproben deutlich höher, so daß an diese Werten die Parameter einer empirischen Verteilung (Lognormal-Verteilung) angepaßt werden konnten. Die berechneten Verteilungen sowie die Einzelwerte sind in Abb. 3.33 und 3.34 dar-

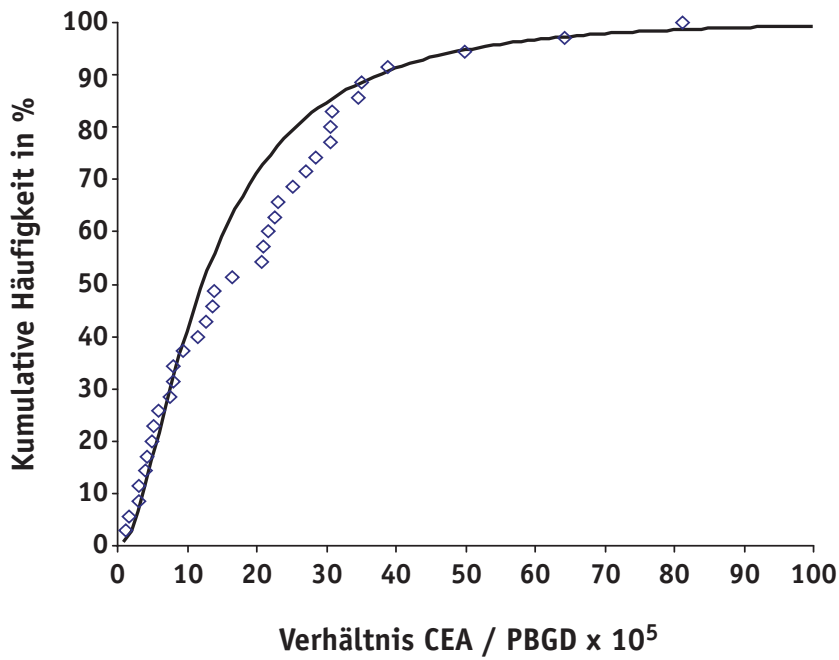


Abb 3.33 Anpassung einer Lognormal-Verteilung (Linie) an die Hintergrundexpression von CEA in Blutproben gesunder Spender (Datenpunkte).

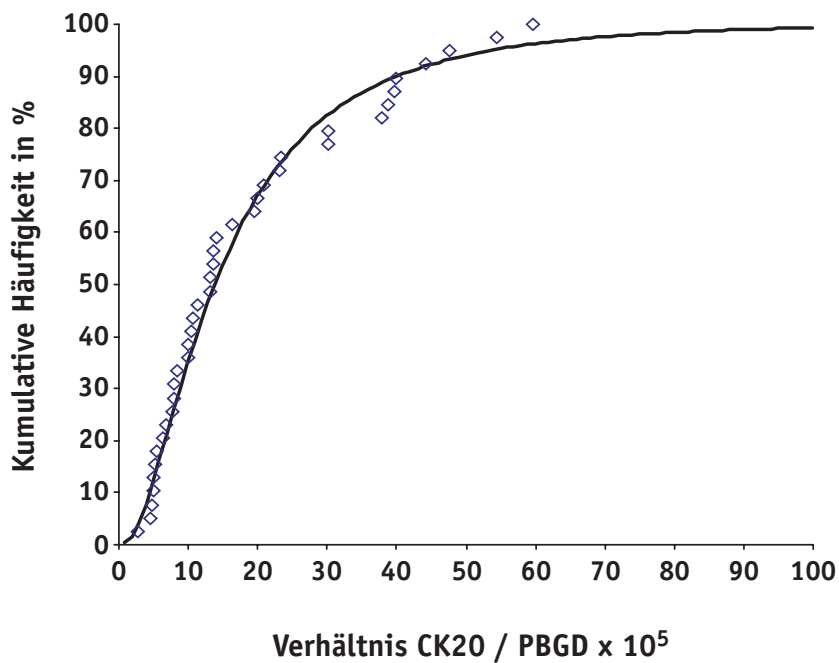


Abb 3.34 Anpassung einer Lognormal-Verteilung (Linie) an die Hintergrundexpression von CK20 in Blutproben gesunder Spender (Datenpunkte).

gestellt. Als Grenzwert für das Marker/PBGD-Verhältnis wurde die 99%-Perzentile festgelegt, die für CEA und CK20 einem Marker/PBGD-Verhältnis von 93×10^{-5} bzw. von 95×10^{-5} entspricht.

In Strategie II wurden alle Marker/PBGD-Verhältnisse als positiv gewertet, die den Maximalwert in Gesundblut überschritten haben.

3.3.2 Nachweis von Tumorzellen in manipulierten Blutproben

Um die Abhängigkeit des Tumorzellnachweises im Blut vom Expressionsniveau des mRNA-Markers zu bestimmen, wurden Gesundblutproben vor der Aufarbeitung mit unterschiedlichen Mengen von COLO205-Zellen versetzt (Abb. 3.35).

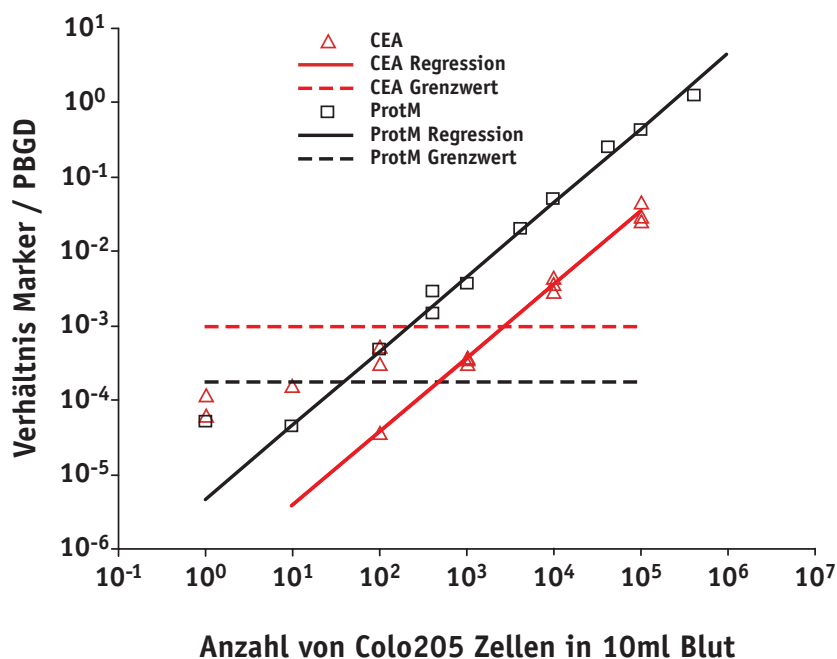


Abb 3.35 Messung der relativen ProtM- und CEA-Transkript-Menge in mit COLO205-Zellen versetzten Blutproben gesunder Spender. Die jeweilige Hintergrundexpression nach Strategie I ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Wenn ProtM als Tumormarker verwendet wurde, ließen sich Tumorzellen im Blut identifizieren, wenn deren Anzahl höher als 36/10ml Blut (etwa 1 Zelle/ 2×10^6 MNC) war. Bezüglich CEA mußten dafür mindestens 2300 Zellen in 10ml Blut vorliegen (1 Zelle/ 4×10^4 MNC) und für CK20 etwa 10^5 Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt). WT1 wird nicht in COLO205-Zellen

exprimiert. Die Sensitivitätsunterschiede resultieren aus den verschiedenen Expressions-Niveaus der entsprechenden Marker in COLO205-Zellen (ProtM : CEA : CK20 = 1000 : 66 : 3,8, entsprechend der Verlagerung der Regressionsgeraden nach rechts) und unterschiedlich starker Hintergrund-Expression im Gesundblut. Diese Ergebnisse sind spezifisch für COLO205-Zellen. Experimente mit CX2-Zellen sollten ähnlich ausfallen, während man entsprechend Abb. 3.31 für die anderen Zelllinien völlig unterschiedliche Ergebnisse erwarten würde.

3.3.3 Expression von ProtM, CEA, CK20 und WT1 in Blutproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom

ProtM-Transkripte wurden in 17%, CEA in 86%, CK20 in 88,4% und WT1 in 46,5% der Patientenblutproben nachgewiesen. Bis auf WT1 sind damit die Nachweishäufigkeit ähnlich wie im Gesundblut. Bei Anwendung der Grenzwert-Strategie I (II), sind 1 (2), 15 (18), 5 (20) bzw. 1 (2) von 237 Blutproben der 129 Patienten positiv für ProtM, CEA, CK20 oder WT1 (Abb. 3.36-3.39).

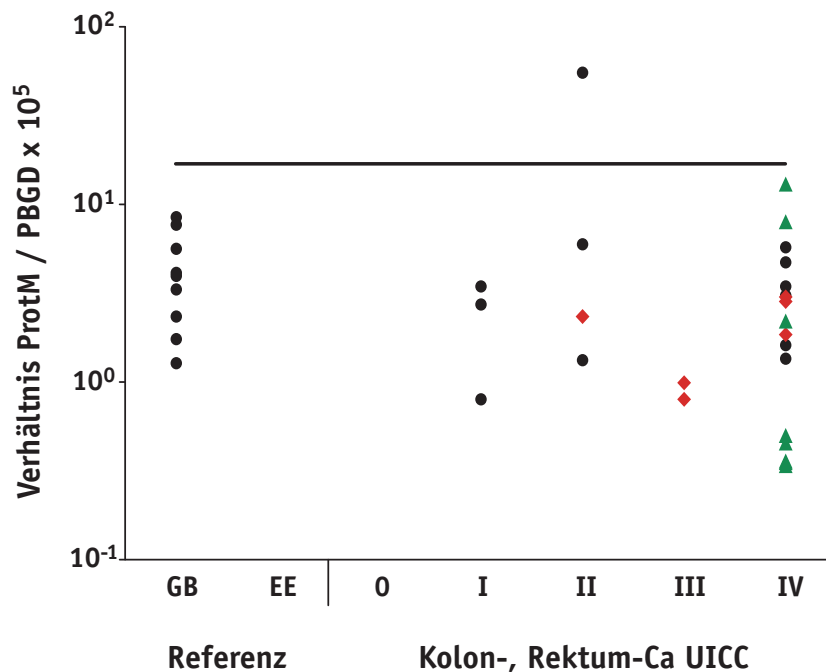


Abb 3.36 Messung der relativen ProtM-Transkript-Menge in Blutproben gesunder Spender (GB), von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen (EE) und von Patienten mit kolorektalem Karzinom (schwarz: präoperativ, rot: postoperativ, grün: unter Chemotherapie, Linie: Hintergrundexpression nach Strategie I).

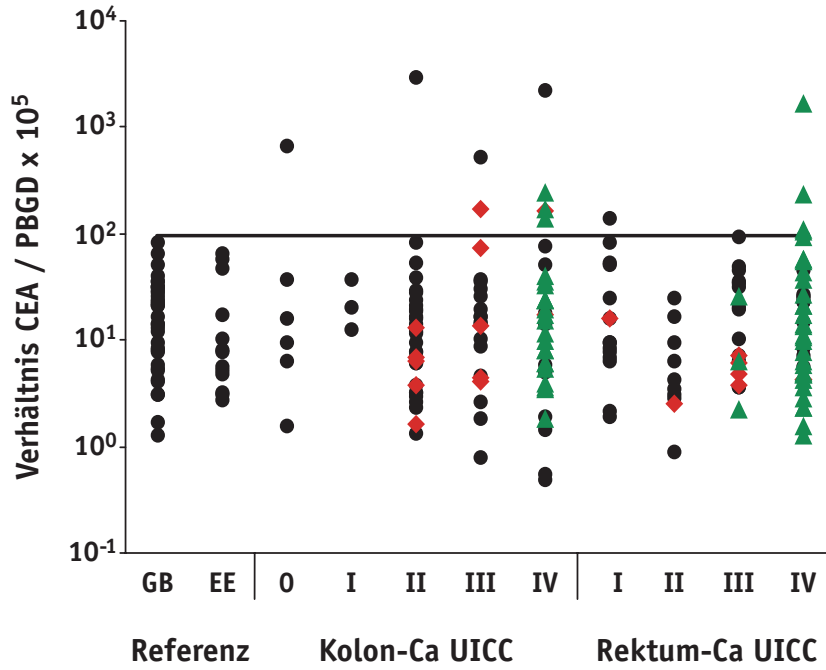


Abb 3.37 Messung der relativen CEA-Transkript-Menge in Blutproben. (Erklärung siehe Abb. 3.36)

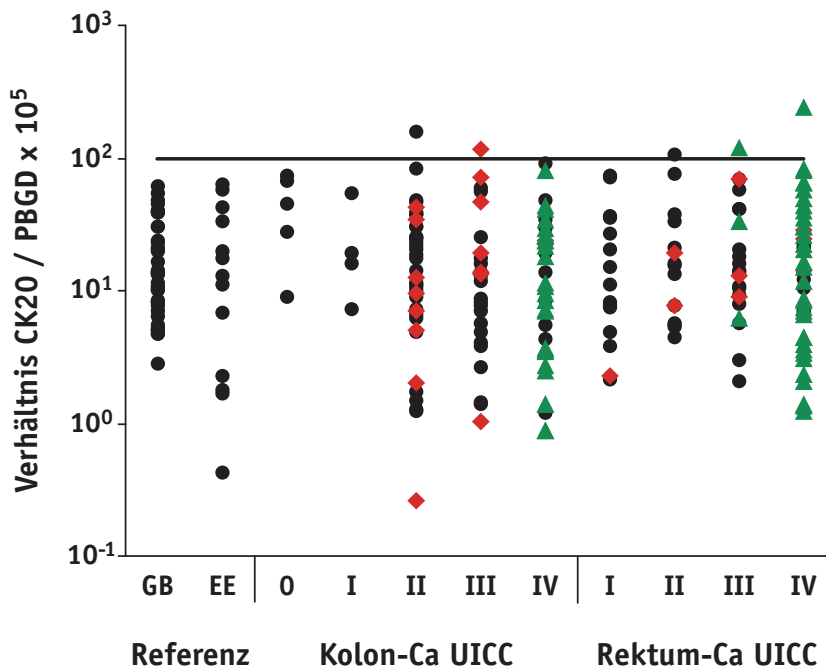


Abb 3.38 Messung der relativen CK20-Transkript-Menge in Blutproben. (Erklärung siehe Abb. 3.36)

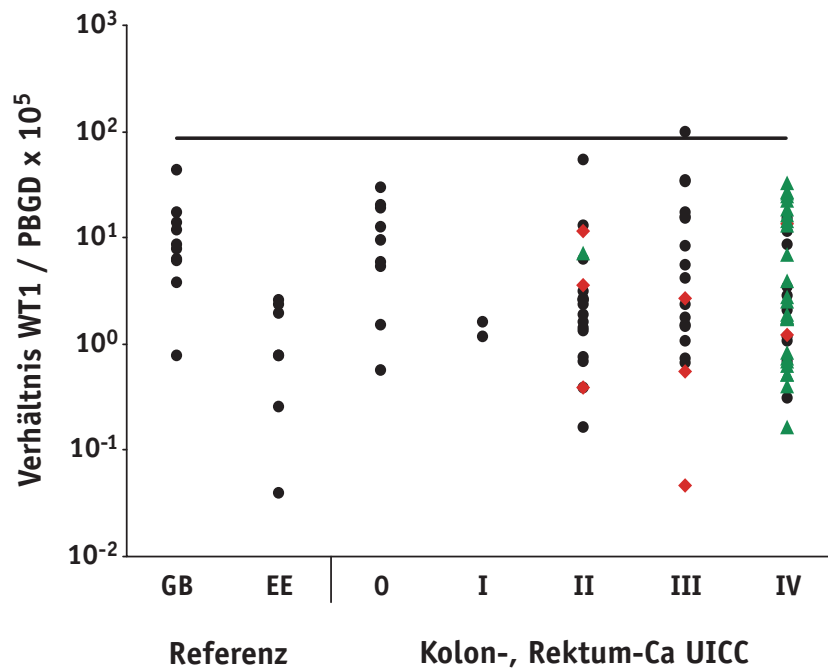


Abb 3.39 Messung der relativen WT1-Transkript-Menge in Blutproben.
(Erklärung siehe Abb. 3.36)

Lediglich eine einzige Blutprobe (Rektum Karzinom UICC IV) war positiv für mehr als einen Marker (CEA, CK20). Für einen anderen Patienten (Kolon Karzinom UICC IV) war eine Blutprobe positiv für CEA und die zweite für CK20. Eine stark erhöhte Marker-Expression (mehr als das 5-fache der Hintergrund-Expression) wurde in fünf Blutproben für CEA und in einer für ProtM gefunden. Betrachtet man alle Blutproben, die nach Strategie I für mindestens einen Marker positiv sind, so haben 17 von 129 Patienten (13,2%) eine erhöhte Tumormarker-Expression im Blut (Tabelle 3.3). Unter Anwendung der Grenzwert-Strategie II steigt dieser Anteil auf 22,5%, wobei auch ein Patient mit einer entzündlichen Erkrankung sowie drei der Patienten mit einem Adenom als positiv gewertet werden würden. In beiden Fällen lässt sich keine Korrelation zwischen dem Prozentsatz der positiven Patienten oder der Höhe der Marker-Expression und dem Krankheitsstadium feststellen.

Tab. 3.3 Anzahl der Patienten, deren Blutproben als positiv für die Marker ProtM, CEA, CK20 oder WT1 unter Anwendung der Strategie I oder II eingestuft wurden. Die Anzahl der Patienten, die für mindestens einen Marker positiv waren, ist unter „Alle Marker“ aufgeführt.

	Anz.	Strategie I					Strategie II							
		ProtM	CEA	CK20	WT1	Alle Marker	ProtM	CEA	CK20	WT1	Alle Marker			
Alle Patienten	129	1	12	5	1	17	13,2%	2	14	16	2	29	22,5%	
Kolon-Karzinom UICC-Stadium	gesamt	69	1	8	2	1	11	15,9%	2	8	8	2	18	26,1%
	0	4	0	1	0	0	1	25,0%	0	1	2	0	3	75,0%
	I	3	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	0	0	0%
	II	23	1	1	1	0	3	13,0%	1	1	2	1	5	21,7%
	III	15	0	2	1	1	3	20,0%	0	2	2	1	4	26,7%
	IV	24	0	4	0	0	4	16,7%	1	4	2	0	6	25,0%
Rektum-Karzinom UICC-Stadium	gesamt	60	0	4	3	0	6	10,0%	0	6	8	0	11	18,3%
	I	8	0	1	0	0	1	12,5%	0	1	1	0	2	25,0%
	II	11	0	0	1	0	1	9,1%	0	0	1	0	1	9,1%
	III	18	0	1	1	0	2	11,1%	0	1	3	0	4	22,2%
	IV	23	0	2	1	0	2	8,7%	0	4	3	0	4	17,4%
	GB	47	0	0	0	0	0	0%	0	0	0	0	0	0%
EE	13	0	0	0	0	0	0%	0	0	1	0	1	7,7%	

36 der 47 Patienten des UICC-Stadiums IV hatten zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Chemotherapie oder wurden mit einer Vaccinierung behandelt. Die restlichen 11 wurden primär operiert. Der Prozentsatz der Patienten, deren Blutproben erhöhte Marker-Konzentrationen zeigte (Strategie I), war 11,1% (Chemotherapie/Vaccination) bzw. 9,1% (präoperativ entnommenes Blut). Von 10 Patienten (Chemotherapie/Vaccination) konnten Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten mit mindestens einer Woche Abstand gewonnen werden. Für 8 von ihnen ergaben sich die gleichen Ergebnisse für alle Entnahmen (7 negativ, 1 positiv). Ein Patient war negativ in zwei Untersuchungen im Abstand von einer Woche und positiv nach 3 Monaten. Ein anderer war anfangs negativ, nach 3 und 4 Monaten positiv, nach 5 Monaten wieder negativ und schließlich wiederum positiv nach 6 Monaten.

3.3.4 Vergleich prä- und postoperativ entnommener Blutproben

Für 19 Patienten konnten sowohl prä- als auch postoperativ Blutproben gewonnen werden. Alle präoperativen Proben waren negativ für alle der betrachteten Marker (Strategie I). Eine Woche nach der Operation blieben die Proben von 17 Patienten negativ, während für einen Patienten (Kolon-Karzinom UICC III) eine Probe erhöhte CEA-Konzentrationen und die andere erhöhte CK20-Konzentrationen aufwies. Für einen zweiten Patienten konnten ebenfalls erhöhte CEA-Konzentrationen gemessen werden.

3.3.5 Vergleich der Sensitivität bei Entnahme von einer versus zwei Blutproben

Für 70 Patienten war es möglich, zwei Blutproben zu einem Zeitpunkt zu gewinnen. In 59 Fällen waren beide Proben negativ und in einem Fall positiv (Strategie I). Dagegen waren bei den restlichen 10 Patienten jeweils eine Probe positiv und die andere negativ. Betrachtet man alle Patienten mit zwei Blutproben, so wurden 8,6% der Proben als positiv gewertet (UICC-0 bis -III: 10%, UICC-IV: 5,7%). Für das Patientenkollektiv mit einer Blutprobe waren 9 von 97 Proben positiv (9,3% , (UICC-0 bis -III: 7,1%, UICC-IV: 13,6%)). Werden diese Ergebnisse allerdings auf die Anzahl der Patienten mit positiven Blutproben bezogen, so ergibt sich, daß 18% der Patienten mit zwei Proben und nur 10% der mit einer Probe als positiv gewertet wurden (UICC-0 bis -III: 18,6% versus 7,9%, UICC-IV: 17,6% versus 12,9%).

3.3.6 Verteilung der PBGD-Expression in positiven Blutproben

Um den potentiellen Einfluß der PBGD-Konzentration auf den Nachweis von ProtM-, CEA-, CK20- und WT1-Transkripten zu ermitteln, wurden die absoluten PBGD-Werte der 21 PCR-positiven Blutproben (Strategie I) mit allen Proben verglichen (Abb. 3.40). Die PBGD-Werte der PCR-positiven Blutproben sind gleichverteilt über den Bereich unterhalb der 75%-Perzentile (80226 NSM) mit einem Median in den positiven Proben von 29556 NSM (im Bereich der 25%-Perzentile (31102 NSM)). 5 positive Proben waren unterhalb der 10%-Perzentile (<21867 NSM), 10 zwischen der 10%-Perzentile und dem Median (50949 NSM) und 5 zwischen dem Median und der 75%-Perzentile (<80226 NSM).

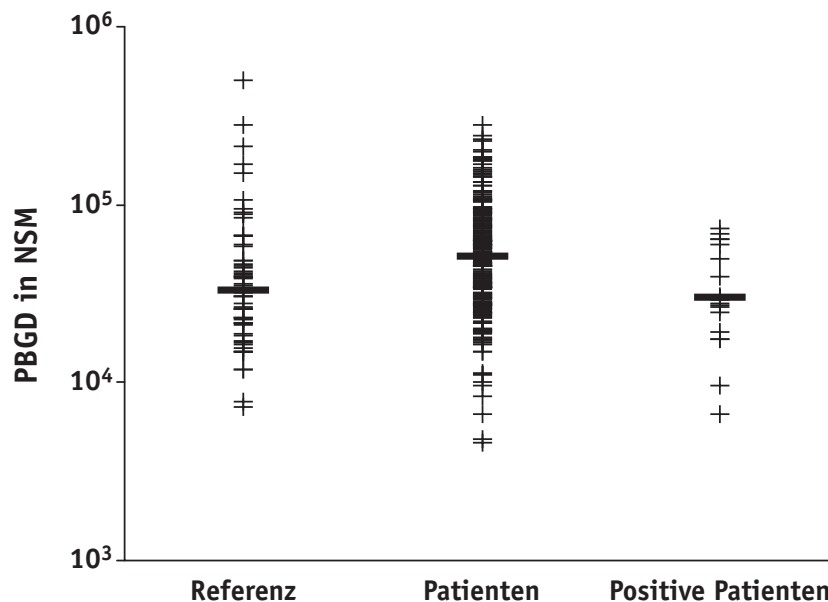


Abb 3.40 Anzahl der PBGD-Transkripte in Blutproben des Referenz-, des gesamten Patientenkollektivs und der Patienten mit Marker-positiven Blutproben (Querstrich: Median).

3.4 Nachweis von Tumormarkern im Knochenmark

Von den 21 Referenz-Knochenmarkproben zeigten lediglich 7 einen unauffälligen Befund im Knochenmarkausstrich. In 48%, 90%, 62% und 81% der Proben waren ProtM-, CEA-, CK20- und WT1-mRNA nachweisbar. Betrachtet man nur die Proben mit unauffälligem Befund so veränderten sich die Werte auf 29%, 86%, 71% und 100% für die betrachteten Marker. In den Knochenmarkproben der 10 Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden ProtM-, CEA-, CK20- und WT1-mRNA-Transkripte in 5%, 100%, 90% und 100% der Fälle nachgewiesen. Abb. 3.41 und 3.42 zeigen die Gegenüberstellung der quantitativen Ergebnisse für Referenz- und Patienten-Knochenmark bezüglich PBGD und G6PD als HKG. Im Vergleich zu den Referenz-Knochenmarkproben liegen alle Patienten-Proben unterhalb des Maximalwertes der Referenzproben. Benutzt man nur die als normal befundeten Referenzproben, so liegen einige der Patienten-Proben geringfügig über den ersteren, allerdings alle unterhalb des doppelten Maximalwertes. Die entsprechenden Blutproben der 10 Patienten waren ebenfalls alle negativ.

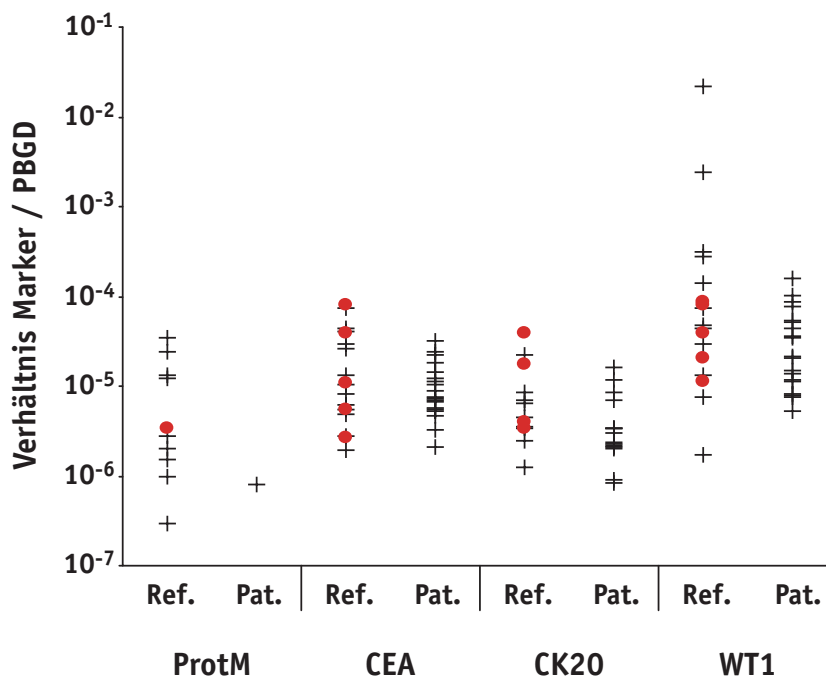


Abb 3.41 Anzahl der Marker-Transkripte bezogen auf PBGD-Transkripte in Knochenmarkproben des Referenz (Ref.)- und des Patientenkollektivs (Pat.). Die rot dargestellten Messwerte stammen von als normal befundeten Referenzknochenmarkproben.

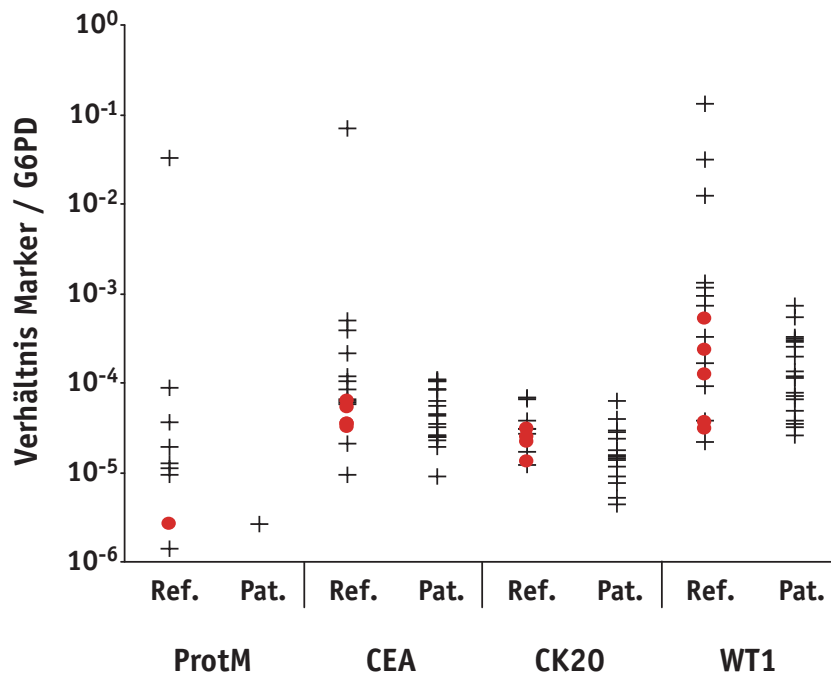


Abb 3.42 Anzahl der Marker-Transkripte bezogen auf G6PD-Transkripte in Knochenmarkproben des Referenz (Ref.)- und des Patientenkollektivs (Pat.). Die rot dargestellten Messwerte stammen von als normal befundenen Referenzknochenmarkproben.

3.5 Nachweis von epithelialen Zellen in Knochenmarksausstrichen

Für den Nachweis von epithelialen Zellen mittels immunzytochemischer Methoden wurden Knochenmarksausstriche verwendet, um den Verlust von Zellen durch Aufarbeitungsschritte wie die Isolierung von mononukleären Zellen zur Herstellung von Zytospins zu vermeiden. Der Nachteil von Nativausstrichen liegt in der Verunreinigung mit diversen Bestandteilen des Blutplasmas sowie mit Erythrozyten, was die Erhaltung der Morphologie bei den anfänglichen Fixierungsschritten erheblich erschwerte. Es wurde zunächst der EPImed-Kit getestet, der bei der Färbung der COLO 205 Zellen als Referenzprobe gute Ergebnisse zeigte. Bezüglich der Knochenmarksausstriche dagegen konnte durch den anfänglichen Waschschrift mit einer Detergenz-haltigen Lösung kein befriedigendes Ergebnis bezüglich der Morphologie erreicht werden. Die Anwendung alternativer Fixierungsschritte (Azeton, MAF) führte nicht zu einer ausreichenden Anfärbung der Zellen. Die Verwendung des Nexell-Kits führte zu wesentlich besseren morphologischen Resultaten (70-90% der Zellen gute Morphologie, Abb. 3.43, 3.44). Eine

weitere Verbesserung konnte durch andere Fixierungssubstanzen nicht erzielt werden, da Azeton nur unzureichend fixiert, d.h. Zellen gehen durch die vielen Inkubations- und Waschschrirte verloren bzw. werden beschädigt, und MAF behindert auch hier die Farbreaktion.

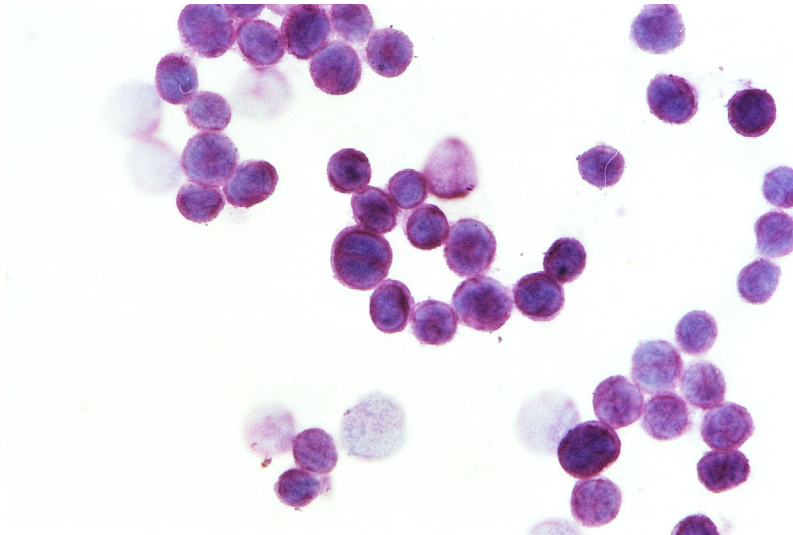


Abb 3.43 Färbung von COLO205-Zellen mit einem Anti-Zytokeratin-Antikörper unter Verwendung des Nexell-Kits. Das Zytoplasma ist nach der Farbreaktion rot-violett dargestellt, während die Zellkerne durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau-violett imponieren.

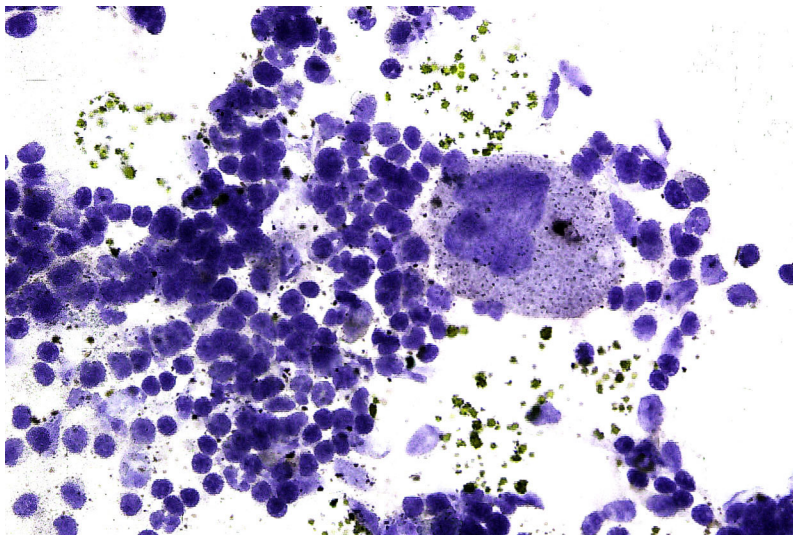


Abb 3.44 Färbung eines normalen Knochenmarkausstriches mit einem Anti-Zytokeratin-Antikörper unter Verwendung des Nexell-Kits. Die Zellkerne der hämatopoetischen Zellen sind durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau-violett dargestellt. Zytokeratin-positive Zellen sind hier nicht zu erkennen.

In den untersuchten Knochenmarksausstrichen konnte kein definitiver Nachweis von epithelialen Zellen erbracht werden. Unter den angefärbten Zellen ließen sich zwei Fälle unterscheiden: 1. rot gefärbtes Zytoplasma mit der Morphologie von hämatopoetischen Zellen

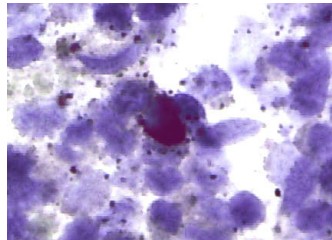


Abb 3.45 Falsch positiv gefärbte hämatopoetische Zelle im Knochenmarksausstrich eines Referenz-Patienten mit M. Wegener.

und 2. aus morphologischer Sicht möglicherweise epitheliale Zelle mit allerdings untypisch gesprenkeltem Abfärben des Zytoplasmas.

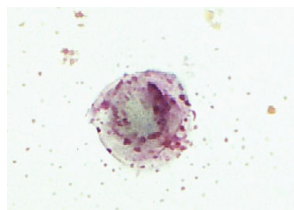


Abb 3.46 Fragliche epitheliale Zelle mit schwacher rot-violetter Zytoplasmafärbung nach Anwendung des Nexell-Kits im Knochenmarksausstrich eines Patienten mit kolorektalem Karzinom.

Das erstere entspricht einem falsch positiven Nachweis, während der zweite Fall unklar bleibt.