

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
des Universitätsklinikums Münster
- Direktor: Univ. Prof. Dr. G. Assmann -

Entwicklung einer RT-PCR-Methode zur molekularen Analyse
von Expression und Amplifikation des *c-erbB-2*-Onkogens

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Görz, Michael

aus Dortmund

- 2004 -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan:	Univ. Prof. Dr. H. Jürgens
1. Berichterstatter:	Univ. Prof. Dr. B. Brandt
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. H. J. Schulze
Tag der mündlichen Prüfung:	10.03.2005

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
des Universitätsklinikums Münster
- Direktor: Univ. Prof. Dr. G. Assmann -
Referent: Univ. Prof. Dr. B. Brandt
Koreferent: Priv. Doz. Dr. H. J. Schulze

ZUSAMMENFASSUNG

Entwicklung einer RT-PCR-Methode zur molekularen Analyse von Expression und Amplifikation des *c-erbB-2*-Onkogens
Michael Görz

Die in einer Reihe von menschlichen Karzinomen nachweisbare Überexpression des zur EGFR-Familie (epidermal growth factor receptor family) gehörenden Wachstumsfaktors ErbB2 stellt beim Mammakarzinom auch einen entscheidenden Prognosefaktor dar. ErbB2-abhängige Mammakarzinome zeigen eine Chemoresistenz gegenüber Apoptose vermittelnden Therapeutika wie Paclitaxel (Taxol), sind zumeist deutlich aggressiver und invasiver als Östrogen-Rezeptor-positive Tumoren und sprechen auf eine Therapie mit Anti-Östrogenen wie Tamoxifen kaum oder gar nicht an. Es ist daher notwendig, solche Patientinnen zu erkennen um suffiziente Therapieschemata erarbeiten zu können.

Hierzu habe ich in meiner Arbeit Methoden erarbeitet, mit denen ErbB2-mRNA, also die Ursache für eine erhöhte Rezeptordichte auf den Zelloberflächen nachgewiesen werden kann.

Zum semi-quantitativen ErbB2-mRNA Nachweis wurden kompetitive PCR-Methoden verwendet. Der zu untersuchenden RNA-Probe wurde hierbei zu Beginn der Untersuchung ein bis auf eine mittels Restriktionsenzym spaltbare, zentral gelegene Basensequenz exakt der zu untersuchenden Zielsequenz entsprechendes Oligonukleotid hinzugefügt.

Zunächst wurde eine klassische 2-Schritt-RT-PCR mit getrennter Umschrift der RNA in cDNA und 1. PCR sowie einer anschließenden 2., so genannten nested-PCR verwendet. Vereinfacht wurde dieses System durch Einführung einer 1-Schritt-RT-PCR, bei der Umschrift und 1. PCR ohne weitere Pipetierschritte direkt in einem Ansatz, respektive Reaktionsgefäß durchgeführt wurden. Gegenüber der klassischen 2-Schritt-RT-PCR zeigte sich diese Methode durch Zeit- und Materialeinsparung, Reduktion der Kontaminationsgefahr, vor allem aber durch eine verbesserte Empfindlichkeit aus, was den Nachweis bis zu einer RNA-Konzentration von 10 pg, also etwa einer Zelle ermöglichte.

Als schnell durchführbare, wenig störanfällige Alternative zur kompetitiven RT-PCR wurde basierend auf der 1-Schritt-RT-PCR dann ein 5'-Nuklease-Assay entwickelt. Hierbei wird dem Untersuchungsansatz ein speziell auf das spezifische Primerpaar abgestimmtes, doppelt Fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (Sonde) hinzugefügt, welches sich hinter dem upstream-primer (3' → 5') an das template anlagert. Durch die 5'-3'-Exonukleasefähigkeit der Taq-Polymerase kommt es in der Elongationsphase der PCR zur Hydrolyse der Sonde und somit zu einer räumlichen Trennung der beiden, am 3'- und 5'-Ende platzierten Fluorophore.

Bei Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) kann dann die bei intakter Sonde aufgrund der räumlichen Nähe durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückte Fluoreszenz des am 5'-Ende platzierten Fluorophors mit Hilfe eines Fluorimeters erfasst werden. Mit dieser Methode gelingt mit nur einer kombinierten Umschrift und PCR durch direkte Messung im Fluorimeter noch der Nachweis von 100 pg ErbB2-mRNA, also von etwa 10 Zellen im Versuchsansatz.

Im Weiteren sollte schließlich hierauf aufbauend eine *in situ*-RT-PCR entwickelt werden. Bei den unterschiedlichen Zellpräparationen ließ sich jedoch keine Kombination aus Fixierung und Permeabilisierung finden, die einen Übertritt der eingesetzten Reagenzien in das Zellkompartiment, bei gleichzeitigem Schutz vor einer Diffusion der gebildeten Produkte durch die Zellmembran aus der Zelle heraus sowie eine Versiegelung des Zellkerns zum Schutz vor DNA-Amplifikation ermöglicht.

Bei entsprechender Zellpräparation konnte jedoch nach der PCR im zellfreien Überstand ErbB2-cDNA nachgewiesen werden, wodurch unter direktem Einsatz der vorbehandelten Zellen ein RNA-Nachweis auch ohne eine aufwendige RNA-Isolation gelingt. Somit hat man ein ideales Screening-Verfahren um schnell und kostengünstig eine zumindest semi-quantitative Aussage über den ErbB2-mRNA-Gehalt einer Probe zu erhalten. Berücksichtigt werden muss hier jedoch eine mögliche Verfälschung des Ergebnisses durch gleichzeitig mit amplifizierte DNA.

Diesbezüglich deutlich weniger störanfällig ist daher weiterhin die Untersuchung von isolierter RNA. Weitere Untersuchungen, z.B. in Form einer real-time-RT-PCR lassen sich ideal auf dieser Methode aufbauen.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2005

1. Einleitung.....	1
1.1. Risikofaktoren.....	1
1.2. Metastasierung.....	2
1.3. Die TNM-Klassifikation (Union Internationale Contre le Cancer, UICC).....	3
1.4. Tumormarker und ihre Bedeutung.....	6
1.5. Prognosefaktor ErbB2.....	6
1.6. Detektion von Gendosisveränderungen.....	8
1.7. Die Polymerasekettenreaktion.....	9
1.7.1. Das Prinzip der PCR.....	9
1.7.2. Quantitative PCR-Methoden.....	10
1.7.3. Differentielle PCR.....	10
1.7.4. Kompetitive PCR.....	11
2. Material und Methoden.....	12
2.1. Material.....	12
2.1.1. Geräte.....	12
2.1.2. Chemikalien.....	12
2.1.3. Standardpuffer.....	13
2.1.4. Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.5. Kits und fertige Lösungen.....	14
2.1.6. Enzyme.....	14
2.1.7. Oligonukleotide.....	14
2.1.8. Größenmarker.....	15
2.1.9. Zellen und Zelllinien.....	15
2.1.10. Zellkulturmedium zur Kultivierung von Mamakarzinomzellen.....	15
2.2. Methoden.....	16
2.2.1. Kultivierung der Mammakarzinomzelllinien.....	16
2.2.2. Isolierung der RNA mit RNAeasy Kit.....	16
2.2.3. Kompetitive RT-PCR.....	17
2.2.4. UV-Spektrometrie.....	18
2.2.5. Umschrift in cDNA und erste PCR.....	19
2.2.5.1. SuperScript™ Preamplification System for cDNA Synthesis.....	19
2.2.5.2. Erste PCR-Reaktion von cDNA-templates.....	19

2.2.6. Titan™ One Tube RT-PCR System	21
2.2.7. Polymerasekettenreaktion (nested-PCR)	22
2.2.8. Restriktion.....	23
2.2.9. Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.2.10. Quantifizierung von DNA.....	25
2.2.11. RT-PCR mit der TaqMan®-Sonde.....	25
2.2.11.1. Sondendesign.....	27
2.2.11.1.1. Platzierung des Quenchers.....	27
2.2.11.1.2. Mg ²⁺ -Ionen-Konzentration.....	27
2.2.11.1.3. Basensequenz.....	27
2.2.11.1.4. Reinheit der Sonde.....	28
2.2.11.1.5. Hybridisierung.....	28
2.2.11.1.6. Platzierung von Sonde und Primerpaar.....	28
2.2.11.1.7. Spezielle Bedingungen für die RT-PCR.....	28
2.2.11.2. Bereitstellung der RNA.....	29
2.2.11.2.1. Isolierung der RNA mit RNeasy-Kit.....	29
2.2.11.2.2. Fixierung und Permeabilisierung der Zellen.....	29
2.2.11.3. Umschrift und PCR mit dem Titan™ One Tube RT-PCR-System.....	30
2.2.11.4. Detektion am Fluorimeter.....	31
2.2.12. Zellaufreinigung von Blutproben mittels Dichtegradient.....	32
3. Ergebnisse.....	34
3.1. Kompetitive PCR an isolierter RNA.....	34
3.1.1. Standard Reihe (SuperScript™ Preamplification System).....	34
3.1.2. inverse Standard-Reihe (SuperScript™ Preamplification System).....	35
3.1.3. Standard Reihe (Titan™ One Tube RT-PCR-System).....	37
3.1.4. inverse Standard Reihe (Titan™ One Tube RT-PCR System).....	39
3.1.5. Modifikation der Zykluszahl in der Standard Reihe.....	40
3.1.6. Probanden und Patienten.....	42
3.1.6.1. Negativ-Kontrollen.....	42
3.1.6.2. Bluteinmischversuch.....	44
3.1.6.3. Patienten.....	48
3.2. RT-PCR mit der Taqman®-Sonde an isolierter RNA.....	50
3.2.1. Bestimmung der Reaktionsbedingungen.....	50
3.2.1.1. Bestimmung der Annealing-Temperatur.....	51

3.2.1.2. Bestimmung der DMSO-Konzentration.....	52
3.2.1.3. Bestimmung der Annealing- und Synthese-Temperatur.....	52
3.2.2. Verdünnungsreihe.....	54
3.2.3. Bluteinmischversuch.....	55
3.2.4. Reproduzierbarkeit und Analogie.....	56
3.3. IS-RT-PCR mit der Taqman®-Sonde an hierzu präparierten Zellen.....	57
3.3.1. Optimierung der Fixierung und Permeabilisierung.....	57
3.3.1.1. Fixierung und Permeabilisierung: IntraPrepTM.....	58
3.3.1.2. Fixierung: Formalin 3,7%ig.....	60
3.3.1.3. Fixierung und Permeabilisierung: PermeaFixTM.....	60
3.3.2. Laserscanmikroskopie.....	62
4. Diskussion.....	67
4.1. Auswahl der Methodik.....	67
4.2. Probleme der RT-PCR.....	68
4.3. Probleme der in situ PCR.....	69
4.4. Probanden und Patienten.....	70
4.5. Die Bedeutung der Detektion von erbB2 positiven Zellen für die Therapie mit Trastuzumab.....	71
5. Ausblick.....	73
6. Zusammenfassung.....	74
7. Literaturverzeichnis.....	76
8. Danksagung.....	79

1. Einleitung

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor der Frau in den industrialisierten Ländern. Für Deutschland insgesamt sind keine Inzidenzzahlen verfügbar. Legt man die Zahlen des Saarländischen Krebsregisters zugrunde, dürfte die jährliche Neuerkrankungsanzahl bei einem Bevölkerungsanteil von 42 Mio. Frauen in Deutschland ohne In-situ-Karzinome bereits bei mindestens 50 000 liegen. In Deutschland erkrankt somit geschätzt jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom (10).

Das statistische Bundesamt gibt für Gesamtdeutschland für das Jahr 1997 18.378 (11) und für 1998 17.692 an Brustkrebs verstorbene Frauen an (12).

1.1. Risikofaktoren

Für das Erkrankungsrisiko sind gesicherte Faktoren bekannt (14). Definitionsgemäß wird das relative Risiko zu einer Bezugsgruppe berechnet, die den entsprechenden oder eine Gruppe von Risikofaktoren nicht aufweist (13).

Risikofaktor	relatives Risiko
Familiäre Belastung (Verwandtschaft ersten Grades)	1,4–13,6
Alter (≥ 50 Jahre vs. < 50 Jahre)	6,5
Gutartige Brusterkrankung: atypische Hyperplasie	4,0–4,4
Alter bei erster Lebendgeburt (> 30 Jahre vs. < 20 Jahre)	1,3–2,2
Alter bei Menopause (≥ 55 Jahre vs. < 55 Jahre)	1,5–2,0
Familiäre Belastung (Verwandtschaft zweiten Grades)	1,5–1,8
Gutartige Brusterkrankung: Biopsie (mit jedem histol. Befund)	1,5–1,8
Alter bei Menarche (< 12 Jahre vs. ≥ 14 Jahre)	1,2–1,5
Hormonersatztherapie (HET)	1,0–1,5

Tabelle 1. Etablierte Risikofaktoren (nach (14))

Mit dem höchsten Risiko ist derzeit das Vorliegen einer Mutation des BRCA1-Gens behaftet, welches allerdings bei weniger als 0, 5% (1:250 bis 1:1000 in den USA) der weiblichen Bevölkerung vorkommt (13).

Während eine orale Kontrazeption (Pille) nach aktueller Datenlage nicht zu einer Erhöhung des Mammakarzinomrisikos führt, wird eine Risikoerhöhung durch eine Hormonersatztherapie (HET) in der Postmenopause beschrieben. Diese ist unabhängig davon, ob Östrogene alleine oder in der Kombination mit Gestagenen gegeben werden und liegt bei einer mehr als fünfjährigen Substitution etwa beim Faktor 1,5 (13).

Die Gesamtmortalität ist allerdings für Frauen mit Hormonersatztherapie (HET) geringer als die von Frauen ohne HET. Auch wenn für das gesamte Kollektiv der hormonsubstituierten Frauen die Gesamtmortalität niedriger ist, ist die Risikoerhöhung bei Vorliegen von einem oder mehreren Risikofaktoren höher und die Indikation zur HET sollte in diesen Fällen kritisch überdacht werden (13).

Ein Zusammenhang zwischen seelischer Belastung und Häufigkeit des Mammakarzinoms wird kontrovers diskutiert, ist als Risikofaktor jedoch allgemein nicht akzeptiert.

Gesicherte Daten zur Häufigkeit und Verteilung von Risikofaktoren und ihrer Kombinationen liegen in Deutschland nicht vor (13).

1.2. Metastasierung

Die Ursache für das Versterben der meisten Krebspatienten liegt nicht im Primärtumor selbst, sondern in den von diesem verursachten Metastasen (griechisch: metastasis = Wanderung), welche durch hämatogene oder lymphogene Streuung im Körper in tumorfernen Bereichen sogenannte Sekundärtumoren bilden.

Unterschiedliche Tumorarten können auch unterschiedliche Metastasierungswege aufweisen. Klinischen Fakten zufolge scheint beim Mammakarzinom eine überwiegend hämatogene Ausbreitung vorherrschend zu sein (23).

In der ersten Langzeitstudie des Mammakarzinoms wurde kein Unterschied in der 5-Jahresüberlebensrate zwischen Patientinnen mit und ohne Karzinomzellen im Blut beobachtet (25). Spezifische Marker zur Detektion maligner Zellen standen jedoch nicht zur Verfügung, so dass die Ergebnisse unter diesem Gesichtspunkt fraglich bleiben. Dennoch bleibt die klinische Relevanz der zirkulierenden Zellen weiter umstritten.

1.3. Die TNM-Klassifikation (Union Internationale Contre le Cancer, UICC)

Im international etablierten TNM-System lässt sich das gesamte Wachstumsspektrum eines malignen Tumors abbilden. Es berücksichtigt sowohl die Ausbreitung des Primärtumors (T) als auch die Lymphknotenmetastasen (N) und die hämatogen entstandenen Fernmetastasen (M). Ist die Klassifikation vom Pathologen am Resektat gesichert worden, wird dem T, N oder M ein p vorangestellt.

Seit 01.01.2003 ist eine neue Einteilung im TNM-System gültig.

Klassifikation des Mammakarzinoms nach dem TNM-System (21, 22)

pT – Primärtumor

pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ (intraduktal oder lobulär) oder Morbus Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor; Morbus Paget: wenn Tumor vorhanden, entsprechend der Größe des Primärtumors klassifizieren!
pTis (DCIS)	Ductales Carcinoma in situ
pTis (LCIS)	Lobuläres Carcinoma in situ
pTis (Paget)	Morbus Paget ohne Nachweis eines invasiven Tumors
pT1mic	Mikroinvasion unter oder gleich 0,1 cm in größter Ausdehnung
pT1a	Tumor mehr als 0,1 cm aber nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung
pT1b	Tumor mehr als 0,5 cm aber nicht mehr als 1,0 cm in größter Ausdehnung
pT1c	Tumor mehr als 1,0 cm aber nicht mehr als 2,0 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor mehr als 2,0 cm aber nicht mehr als 5,0 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 5,0 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut; "Brustwand" = Rippen, Interkostalmuskeln, vorderer Serratus, NICHT aber der Pektoralismuskel
pT4a	Ausdehnung auf die Brustwand

pT4b	Ödem einschließlich Apfelsinenhaut, Ulzeration der Brust oder Sattelitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	Inflammatorisches Karzinom

pN – regionäre Lymphknoten (LK)

pNx	Keine Beurteilung möglich, da nicht entfernt oder schon früher entfernt
pN0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen, keine zusätzliche Untersuchung für isolierte Tumorzellen
pN0 (i-)	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen, Immunhistochemie negativ
pN0 (i+)	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen, Immunhistochemie positiv, keine Zellansammlungen größer als 0,2 mm
pN0 (mol-)	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen, negative RT-PCR
pN0 (mol+)	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen, positive RT-PCR
pN1 mi	Mikrometastasierung (größer als 0,2 mm, keine größer als 2,0 mm)
pN1	Metastasen in 1 bis 3 axillären Lymphknoten und/oder Mammaria-interna-Lymphknoten als Mikrometastasierung, welche durch Sentinel-Lymphknotenbiopsie entdeckt wurde, klinisch nicht fassbar (= durch bildgebende Verfahren außer Lymphographie oder klinische Untersuchung nicht fassbar)
pN1a	Metastasen in 1 bis 3 axillären Lymphknoten
pN1b	Metastasen in Mammaria-interna-Lymphknoten als Mikrometastasierung, welche durch Sentinel-Lymphknotenbiopsie entdeckt wurde, klinisch nicht fassbar
pN1c	Metastasen in 1 bis 3 axillären Lymphknoten und Mammaria-interna-Lymphknoten als Mikrometastasierung, welche durch Sentinel-Lymphknotenbiopsie entdeckt wurde, klinisch nicht fassbar
pN2	Metastasen in 4 bis 9 axillären Lymphknoten oder Mammaria-interna-Lymphknoten ohne gleichzeitige axilläre Metastasierung, klinisch fassbar (= durch bildgebende Verfahren außer Lymphographie oder klinische Untersuchung fassbar)

pN2a	Metastasen in 4 bis 9 axillären Lymphknoten (mindestens eine Tumorabsiedlung größer als 2 mm)
pN2b	Mammaria-interna-Lymphknoten ohne gleichzeitige axilläre Metastasierung, klinisch fassbar
pN3	Metastasen in 10 oder mehr axillären Lymphknoten oder in infraclaviculären Lymphknoten oder in klinisch fassbaren (siehe obige Definition) gleichseitigen Mammaria-interna-Lymphknoten-Metastasen bei gleichzeitiger axillärer Metastasierung in einem oder mehreren axillären Lymphknoten; oder bei Metastasen in mehr als drei axillären Lymphknoten; oder in mehr als drei Lymphknoten mit klinisch nicht fassbarer mikroskopischer Metastasierung der Mammaria-interna-Lymphknoten; oder bei gleichseitigen supraclaviculären Lymphknotenmetastasen
pN3a	Metastasen in 10 oder mehr axillären Lymphknoten (mindestens eine Tumorabsiedlung größer als 2 mm), oder Befall der infraclaviculären Lymphknoten
pN3b	Klinisch fassbare (siehe obige Definition) gleichseitige Mammaria-interna-Lymphknoten-Metastasen bei gleichzeitiger axillärer Metastasierung in einer oder mehreren axillären Lymphknotenmetastasen; oder bei Metastasen in mehr als drei axillären Lymphknoten mit klinisch nicht fassbarer mikroskopischer Metastasierung der Mammaria-interna-Lymphknoten, welche durch Sentinel-Lymphknotenbiopsie entdeckt wurde
pN3c	Gleichseitige supraclaviculäre Lymphknotenmetastasen

Die obige Definition „regionaler Lymphknoten“ bezieht sich auf die axilläre Lymphknotendisektion mit oder ohne Sentinel-Lymphknotenbiopsie. Falls die Einteilung allein auf der Sentinel-Lymphknotenbiopsie beruht, wird dies durch das Kürzel „sn“ hinzugefügt: z.B. pN0(i+)(sn).

pM – Fernmetastasen

pMx	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

1.4. Tumormarker und ihre Bedeutung

Die Prognose beim Mammakarzinom ist entscheidend abhängig vom Metastasierungsgrad zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (8). Neben den klassischen histologischen Untersuchungsmethoden und den zunehmend genaueren bildgebenden Verfahren haben sich im Laufe der Jahre immunzyto-, histochemische sowie molekulare Analyseverfahren zunehmend etabliert und sind als Prognosefaktoren fester Bestandteil von Empfehlungen zur Therapie des Mammakarzinoms geworden (7). Die Mitte der achtziger Jahre von Kary B. Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR) hat hierzu entscheidende Weichen gestellt. Heute in der täglichen Routinearbeit im Labor integriert ermöglicht die PCR die Detektion der molekularen Botenstoffe für die Produktion der so genannten Tumormarker, chemisch zumeist Glycoproteine, also Zucker-Eiweiß-Moleküle, die weitreichend Prognose- und Therapiebestimmenden Charakter haben können. Tumormarker sind z. B. auf der Oberfläche von Tumorzellen nachweisbar und werden zumeist erst bei Krebserkrankungen erstmals im Blut oder in anderen Körperflüssigkeiten in größerer Menge nachweisbar. Tumormarker werden von Krebszellen gebildet und ins Blut abgegeben, oder ihre Bildung wird durch eine Krebserkrankung ausgelöst (6). Ein tumorspezifischer Marker konnte bislang beim Menschen nicht gefunden werden. Verschiedene Tumormarker können bei unterschiedlichen Krebsarten erhöht sein. Auch existieren bei weitem nicht für alle Krebserkrankungen Tumormarker (6).

1.5. Prognosefaktor ErbB2

Eine Reihe von menschlichen Karzinomen weist eine Überexpression des zur EGFR-Familie (epidermal growth factor receptor family) gehörenden Wachstumsfaktors ErbB2 auf (5). Beim Mammakarzinom ist diese Überexpression auch ein entscheidender Prognosefaktor (5).

Die Familie der EGFR (auch Typ-I-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder ErbB-Tyrosin-Kinasen-Rezeptoren genannt) besteht aus den vier homologen Rezeptoren EGFR (ErbB1/HER1),

ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Die Rezeptoren der EGFR-Familie sind aus einer extrazellulären, ligandenbindenden Domäne, einem transmembranösen lipophilen Segment und einer intrazellulären Proteindomäne mit Tyrosinkinaseaktivität aufgebaut. Die Bindung eines Liganden, z. B. des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) oder des transformierenden Wachstumsfaktors α (TGF- α) induziert über eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne eine Dimerisierung, also die Bindung von zwei gleichen (Homodimere) oder zwei verschiedenen (Heterodimere) zur gleichen Familie gehörenden Rezeptoren (17, 18). Der Rezeptor-Dimerisierung folgt eine Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität der intrazellulären Proteindomäne, wodurch neben einer Autophosphorylierung des Rezeptors eine Reihe intrazellulärer Proteine tyrosinspezifisch phosphoryliert werden, was schließlich zu einer Stimulation der Zellproliferation führt (17). Nach der Ligandenbindung werden die Rezeptoren endozytisch internalisiert und durch Verschmelzung mit Lysosomen abgebaut.

Im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren der ErbB-Familie ist für das transmembranöse 185-kDa-Glycoprotein ErbB2 bislang noch kein spezifischer Ligand bekannt. Homodimere von ErbB2 werden (ebenso wie von ErbB3) daher nicht beobachtet. Jedoch ist ErbB2 der bevorzugte Co-Rezeptor für ErbB1, ErbB3 und ErbB4 (17). Hauptpartner ist das ErbB1 (EGFR) und ErbB3. Normalerweise werden Signale von Wachstumsfaktorrezeptoren durch Dissoziation von Ligand-Rezeptor-Komplexen, Dephosphorylierung der aktivierten Rezeptoren, schnelle Internalisierung durch Clathrin-coated Pits und Abbau in Lysosomen schnell inaktiviert (5). Durch Verringerung der Ligandendissoziation, langsame Internalisierung und Vermeidung des degenerativen Abbauwegs durch Zurückkehren an die Zelloberfläche kommt es zu einer deutlich verlängerten Präsenz von ErbB2 an der Zelloberfläche und somit zu einer prolongierten Signalgebung durch die heterogenen Partner.

ErbB2-Überexpression resultiert in einer Hochregulation von aktiven Cyclin-D-CDK4/6-Komplexen (von D-Typ Zyklinen (D1, D2 und D3) aktivierte CDK4 und CDK6) und damit in einer Dysregulation der Zellzyklus-Homöostase (5). Auch der CDK-Inhibitor p21^{Waf1} scheint hier eine wichtige Rolle zu spielen. Unter ErbB2-Überexpression bestehende hohe Cyclin-D-CDK-Aktivität bei gleichzeitig erhöhtem p21^{Waf1} Level scheint sowohl eine Proliferation, als auch eine durch Apoptosevermeidung verlängerte Lebenszeit der Zelle zu induzieren (5). Hierin liegt eine Erklärung für die bei ErbB2-abhängigen Mammakarzinomen beobachtete Chemoresistenz bei der Behandlung mit Apoptose vermittelnden Therapeutika wie Paclitaxel (Taxol).

Von einigen Ausnahmen abgesehen gibt es eine strenge, hoch signifikante inverse Beziehung zwischen dem Status der Östrogen-Rezeptor-Expression und der ErbB2-(respektive ErbB1-)Überexpression (5). Östrogenrezeptor-(ER-)negative Tumoren weisen überdurchschnittlich häufig eine Überexpression von ErbB2 und/oder ErbB1 auf und sind zumeist deutlich aggressiver und invasiver als ER-positive Tumoren. Es ist wenig verwunderlich, dass eine Therapie mit Anti-Östrogenen wie Tamoxifen bei Patienten mit ErbB2-überexprimierenden Tumoren nur mäßig erfolgreich ist (5).

Untersuchungen von A. Rötger konnten belegen, dass ErbB2-positive Zellen eine deutlich erhöhte Invasionstendenz zeigen. Somit scheint ErbB2 auch als wichtiger Metastasierungsfaktor eine Rolle zu spielen.

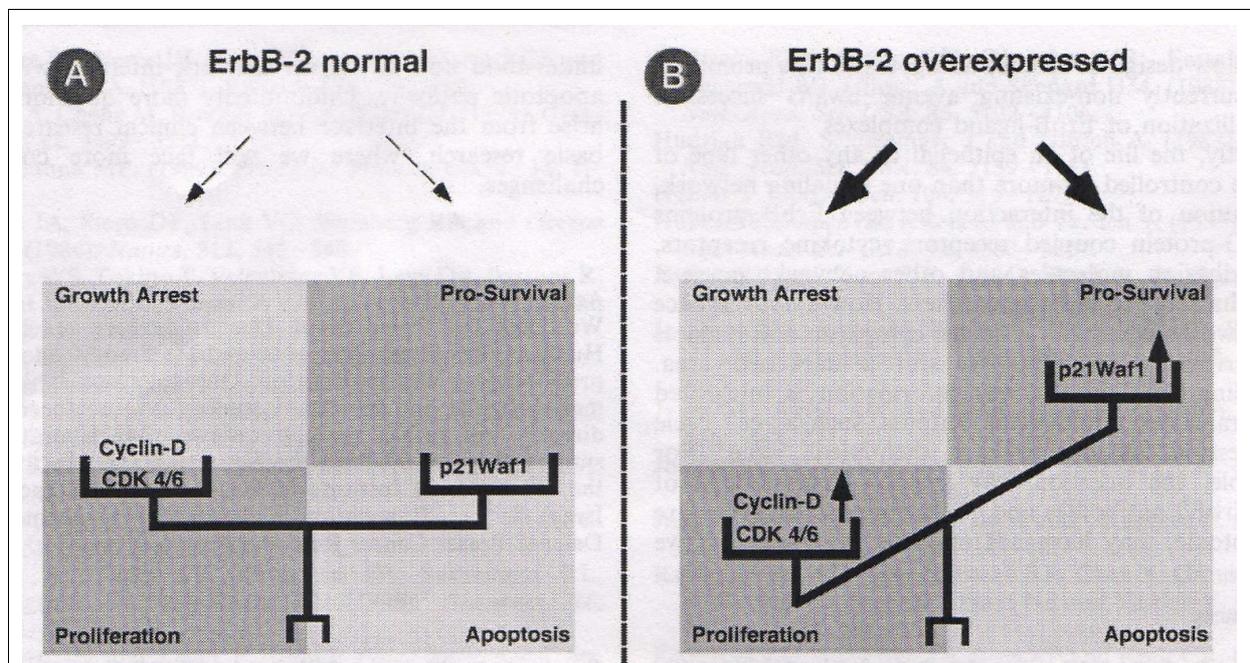


Abbildung 3.6: Apoptose, Differenzierung und Proliferation induziert durch ErbB2 (5)

1.6. Detektion von Gendosisveränderungen

Schechter et al. konnten 1984 im Tierversuch durch eine Behandlung mit Carcinogenen in Ratten die Entwicklung von Neuroglioblastomen und Schwannomen induzieren und wiesen hierbei erstmals ErbB2 als potentes Onkogen nach (27). ErbB2 wird in menschlichen Tumorzellen zwar vergleichsweise selten vorgefunden, bei Vorhandensein zeigt sich jedoch häufig entweder eine erhöhte Gendosis, also eine Amplifikation auf DNA-Ebene und/oder eine Überexpression auf RNA-Ebene. In der Mehrzahl der Fälle geht eine Überexpression von ErbB2 mit einer Chemoresistenz und somit mit einer schlechten Prognose für die Patienten

einher. ErbB2 zeigt beim Mammakarzinom eine Inzidenz von 20-30%. Klinisch ist die Detektion der ErbB2-positiven Patientinnen relevant, da bei einer nachgewiesenen ErbB2-Überexpression von ErbB2-negativen Patientinnen abweichende Therapieschemata zum Einsatz kommen.

1.7. Die Polymerasekettenreaktion

Die Mitte der achtziger Jahre von Kary B. Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion stellt heute eine wesentliche Erleichterung der täglichen Routinearbeit im Labor dar. Durch die PCR wurde es erstmals ohne den Einsatz von Klonierungstechniken ermöglicht, eine fast beliebige Anzahl von Kopien definierter DNA-Fragmente herzustellen. Mit Hilfe der PCR ist es theoretisch möglich, das Vorhandensein einer einzigen Ausgangssequenz durch Amplifikation nachzuweisen.

1.7.1. Das Prinzip der PCR

Es handelt sich bei der Polymerasekettenreaktion um eine Methode der enzymatischen in vitro-Replikation einer durch spezifische „primer“ genau definierten Zielsequenz.

Das eingesetzte Enzym, die DNA-Polymerase, benötigt für die Herstellung eines komplementären DNA-Strangs eine Einzelstrang-DNA-Matrize. Da die DNA der Zellen unter normalen Bedingungen als Doppelstrang vorliegt, müssen die komplementären DNA-Stränge zunächst voneinander getrennt werden. Diese so genannte Denaturierung der doppelsträngigen DNA erreicht man durch Erhitzen. Zum Start der Synthese benötigt die DNA-Polymerase ein kurzes Stück doppelsträngiger DNA, von deren freiem 3'-OH-Ende her dann die komplementären Sequenzen synthetisiert werden. Den Startpunkt der DNA-Synthese kann man also durch den Einsatz eines chemisch synthetisierten Oligonukleotids, dem so genannten „primer“ festlegen. Für die beiden zueinander komplementären DNA-Stränge definiert man durch einen spezifischen „primer“ für jeden Strang („upstream“ und „downstream“) der Ausgangsmatrize einen Startpunkt und grenzt so den zu amplifizierenden Sequenzbereich ein. Die Auswahl von mit hoher Wahrscheinlichkeit nur einmal im Genom vorkommenden Startpunkten ist hierbei für die Spezifität der PCR entscheidend. Mit einer „primer“-Länge von 20-30 Nukleotiden ist in der Regel eine gezielte Eingrenzung von genau einer Zielsequenz aus dem gesamten Genom möglich. Die eigentliche Amplifikation der Zielsequenz geschieht durch die zyklische Wiederholung von Denaturierung, Anlagerung

(Hybridisierung) der “primer”, dem so genannten “annealing” und der DNA-Synthese (Polymerisation).

1.7.2. Quantitative PCR-Methoden

Die Zielsequenz würde durch die PCR unter idealen Bedingungen bei n Zyklen theoretisch um den Faktor 2^n exponentiell amplifiziert. Unter Berücksichtigung der Amplifikationseffizienz der einzelnen Zyklen ergibt sich jedoch eine exponentielle Amplifikation nach der Gleichung $N = N_0 * (1+x)^n$, wobei N der Menge des PCR-Produktes, N_0 der Ausgangsmenge der Zielsequenz vor der PCR, x der durchschnittlichen Amplifikationseffizienz und n der Zykluszahl entspricht. Die Amplifikationseffizienz der PCR ist von unterschiedlichsten Faktoren abhängig. Hierzu zählen z. B. die Ausgangsmenge der Zielsequenz, die Beschaffenheit der “primer”, Länge und Sequenz der Zielregion, “annealing”-Temperatur, Zykluszahl, PCR-Gerät, Enzymeigenschaften, Ionenkonzentration, etc. (18). Mit steigender Produktkonzentration sinkt die Effizienz des Zielsequenz-“primer”-“annealings” zugunsten des Zielsequenz-Zielsequenz-“reannealings” (20). Dieser sogenannte Plateauereffekt limitiert so das Ausmaß der exponentiellen Amplifikation.

Die Startkonzentration einer Zielsequenz ist folglich nicht einfach aus Endkonzentration und Zykluszahl herzuleiten.

Um quantitative Aussagen zu treffen ist es notwendig, die untersuchte Probe gegen eine bekannte DNA-Menge der Zielsequenz abzugleichen. Hierzu kann man bei der PCR einen definierten Standard im selben Untersuchungsansatz mitlaufen lassen um so gleiche Reaktionsbedingungen zu schaffen. Ein solcher Standard kann aus einem bekannten DNA-Fragment bestehen, also beispielsweise einen konstant vorhandenen genetischen Faktor, z.B. β -Actin, darstellen. In diesem Fall spricht man von einer differentiellen PCR. Es kann aber auch ein externer Standard verwendet werden, der in definierter Menge dem Versuchsansatz hinzu gegeben wird. Hierbei spricht man von einer kompetitiven PCR.

1.7.3. Differentielle PCR

Hierbei wird jeder zu untersuchenden Probe sowohl ein Primerpaar für die eigentliche Zielsequenz als auch ein Primerpaar für eine Referenzsequenz zugegeben. Die Referenzsequenz, z.B. β -Actin, soll hierbei eine konstante Gendosis aufweisen. Die

Amplifikationseffizienz von Ziel- und Referenzsequenz ist bei diesem Verfahren immer unterschiedlich, so dass sich die Gendosis der Zielsequenz durch Vergleich der Produktmenge von Ziel und Referenz nicht eins zu eins ableiten lässt.

1.7.4. Kompetitive PCR

Bei dieser Methode wird der zu untersuchenden Probe eine Referenzsequenz von definierter Menge zugegeben. Die Referenzsequenz entspricht hierbei bis auf eine in der Mitte des Strangs gelegenen Modifikation der Basensequenz fast vollständig der durch das Primerpaar eingegrenzten Zielsequenz. Es wird also kein zweites Primerpaar wie bei der differentiellen PCR benötigt. Durch die strukturelle Ähnlichkeit von Ziel- und Referenzsequenz sind die Amplifikationseffizienzen deutlich ähnlicher als bei der differentiellen PCR, sind aber weiterhin nicht identisch. Eine Ableitung der Gendosis an der Referenzsequenz ist also auch bei dieser Methode nicht ganz fehlerfrei.

1.7.5. Der RNA-Nachweis mit Hilfe der PCR

Der Nachweis von RNA erfordert zunächst eine Umschrift in DNA um mit Hilfe der PCR eine Amplifikation durchzuführen. Hierzu werden spezielle Enzyme, die so genannten reversen Transkriptasen verwendet. Diese Enzyme dienen bei Retroviren dazu, das in Form von RNA gespeicherte genetische Material in DNA umzuschreiben. Da RNA eine vergleichsweise kurze Halbwertszeit aufweist, ist ihr Nachweis deutlich schwieriger als der von DNA. Durch Einwirkung von RNAsen wird RNA schnell abgebaut. Der Faktor Zeit ist beim RNA-Nachweis also von größerer Bedeutung.

1.8. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer einfach durchführbaren RT-PCR-Methode zum Nachweis einer Überexpression des ErbB2-Gens im Blut von Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom. Zur methodologischen Umsetzung wurde in dieser Arbeit vorwiegend mit kultivierten Tumorzellen der Linie SK-BR-3 gearbeitet.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Geräteliste	Bezugsquelle
Analysenwaage Modell BP610	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophoresekammer XCell II™	Anamed, Frankfurt a. M.
Fluoreszenzmikroskop Laborlux S	Leica, Wetzlar
Robocycler™ Gradient 40	Stratagene, Heidelberg
UV/VIS Spektrometer Lambda Bio	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Vortex Typ Genie™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Sigma® 101M	Sigma, Deisenhofen
Zentrifuge Sigma® 3E-1	Sigma, Deisenhofen
Flachbrettscanner Epson GT 6000	Epson Deutschland GmbH, Meerbusch
Eppendorf Multipette 1-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Multipette 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Multipette 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Abzug	
Fluorimeter	
UV-Lampe	
Laserscanmikroskop	Leica, Microsystems AG, Wetzlar
Polaroidfilme, Typ 667	Polaroid Corporation, Offenbach

2.1.2. Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Borsäure	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol (50 mM in PBS)	Life Technologies, Eggenstein
EDTA	Sigma, Deisenhofen
DEPC	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Boehringer Ingelheim, Heidelberg

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
NuSieve® GTG Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
SeaKem® GTG Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Tris	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen

2.1.3. Standardpuffer

Lösung	Zusammensetzung
10x TBE-Puffer, pH 8,3	108 g Tris 55 g Borsäure 3,7 g EDTA ad 1 l mit H ₂ O bidest.; autoklavieren
10x PBS, pH 7,4	80 g NaCl 2,0 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ mit 1 N HCl auf pH 7,4; ad 1 l H ₂ O bidest.; autoklavieren

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Lösung	Bezugsquelle
extra dünnwandigen PCR-Gefäßen	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
RNAse freie Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
BD Falcon™ Flasks	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.5. Kits und fertige Lösungen

Kits und fertige Lösungen	Bezugsquelle
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
SuperScript™	GibcoBRL, Eggenstein
Titan™ One Tube RT-PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Nucleotid-Mix (<i>GeneAmp® dNTPs</i>)	Perkin Elmer, Überlingen
IntraPrep™-Permeabilization Reagent	Immunotech Diagnostics, Hamburg
PermeaFix™	Ortho Diagnostics, Inc.

2.1.6. Enzyme

Kits und fertige Lösungen	Bezugsquelle
Rnase-Inhibitor (<i>Rnasin® Ribonuclease Inhibitor</i>)	Promega Corp., Heidelberg
Restriktionsenzym (<i>BspI43 I</i>)	Eurogentec, Seraing
RQ1 DNase	Promega Corp., Heidelberg

2.1.7. Oligonukleotide

Bez.	5'-3'-Sequenz	Verwendung / Bezugsquelle
PC1A	5' -ACG GTG CAG CTG GTG ACA CAG CTT- 3'	äußerer Primer 1 der 1. PCR Eurogentec, Seraing, Belgien
PC1B	5' -CGG CTG CTG GAC ATT GAC GAG ACA- 3'	äußerer primer 2 der 1. PCR Eurogentec, Seraing, Belgien
PC2C	5' -GGA AAA CCG CGG ACG CCT GGG CT- 3'	innerer primer 1 der 2. PCR Eurogentec, Seraing, Belgien
PC2B	5' -TCG GAA CGT GCT GGT CAA GAG TCC C- 3'	innerer primer 2 der 2. PCR Eurogentec, Seraing, Belgien
IS-1	5' -CCC ATA TGT CTC CCG CCT TC- 3'	In situ primer 1 Biometra, Göttingen
IS-2	5' -CTC GTC AAT GTC CAG CAG CC- 3'	In situ primer 2 Biometra, Göttingen
Sonde	5' -CAT CTG CCT GAC ATC CAC GGT GCA- 3'	Applied Biosystems, Weiterstadt

2.1.8. Größenmarker

DNA-Größenmarker	Bezugsquelle
DNA Molecular Weight Marker VIII	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.9. Zellen und Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
SK-BR-3: humane Mammakarzinomzelllinie	ATCC, Manassas, USA
MCF-7: humane Mammakarzinomzelllinie	ATCC, Manassas, USA

2.1.10. Zellkulturmedium zur Kultivierung von Mamakarzinomzellen

Zusätze und Lösungen	Bezugsquelle
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	ICN, Eschwege
1% (v/v) (2mM) L-Glutamin	Life Technologies, Eggenstein
1% (v/v) "Antibiotic-antimycotic solution"/A9909 (10 000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin, 25 µg Amphothericin B in 0,9% NaCl)	Sigma Deisenhofen
10% (v/v) Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Traun, Österreich

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung der Mammarkarzinomzelllinien

Die verwendete Zelllinie SK-BR-3 (s. 2.1.9) wurde bei 37 °C unter einer 5%igen CO₂ Atmosphäre in Zellkulturmedium in 25-cm², 75-cm²- oder 175-cm²-FalconTM-Zellkulturflaschen unter 2mal wöchentlichem Mediumwechsel bis zur Konfluenz kultiviert.

Zur weiteren Verwendung wurde der konfluente einschichtige Zellrasen mit 1x PBS gewaschen. Im Anschluss hieran wurden die Zellen mittels einminütiger Inkubation mit 2,5 bis 5 ml Trypsin/EDTA Lösung bei 37 °C vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Die so erhaltene Zellsuspension wurde entweder unter Zugabe von DMSO in flüssigem Stickstoff bei -196 °C zur späteren Verwendung eingefroren, in neuen Zellkulturflaschen weiter kultiviert oder direkt für die unterschiedlichen Versuche verwendet.

2.2.2. Isolierung der RNA mit RNeasy Kit

Reagenzien:	
RNeasy TM -Kit	Qiagen, Hilden
- RNeasy Spin Columns	
- 1,5 ml Collection Tubes	
- 2 ml Collection Tubes	
- Lysis-Puffer RLT	
- Wasch-Puffer RW1	
- Wasch-Puffer RPE	
- DEPC-H ₂ O	
β-Mercaptoethanol	
Ethanol 70%	
QIAshredder	Qiagen, Hilden
sterile RNase-freie Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg

Die für die Versuchsreihen benötigte “template”-RNA wurde aus SK-BR-3 Tumorzelllinien und aus Lymphozyten isoliert. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des kommerziellen RNA-Isolierkits RNeasyTM der Firma Qiagen, Hilden. Das Prinzip des Kits beruht auf der Zelllyse mit anschließender Absorption der RNA an einer speziellen Isolierungssäule, Aufreinigung und schließlich der Elution mittels sterilen Wassers. Die Arbeitsvorschrift des Kits wurde unverändert übernommen.

Durchführung:

Kultivierte Zellen der sich vom Mammakarzinom ableitenden Tumorzelllinie SK-BR-3 wurden 5 min bei 550 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das in PBS aufgeschwemmte Zellpellet wurde unter Zusatz von PBS erneut 5 min bei 550 x g zentrifugiert um Reste des Nährmediums zu entfernen. Erneut in PBS aufgeschwemmt wurde die Zellzahl mittels einer Zählkammer bestimmt und durch weiteren Zusatz von PBS eine dem Reaktionsspektrum des Kits entsprechende Zellzahl eingestellt. Ein Teil der gewonnenen Kulturzellen wurde dann mittels Lysis-Puffer RLT lysiert. Das so gewonnene Lysat kann bei –70 °C für einige Wochen gelagert werden. Mit Hilfe des QIAshredder erfolgte der Arbeitsvorschrift entsprechend die Homogenisierung des Lysats. Das zellfreie Lysat wurde nach Zugabe von 70%igem Alkohol sukzessive 15 sec bei 8000 x g über die RNeasy-Säule zentrifugiert. Die RNA bindet sich hierbei an die Matrix der Säule. Hieran anschließend wurde zunächst mit Wasch-Puffer RW1, dann mit Wasch-Puffer RPE jeweils 15 sec bei 8000 x g gewaschen. Einem letzten Waschschrift mit Wasch-Puffer RPE für 2 min bei 8000 x g schloss sich die Elution der an die Säulenmatrix gebundenen RNA mittels sterilem DEPC-Wasser für 1 min bei 8000 x g an. Die gewonnene RNA wurde zum Großteil zur längerfristigen Aufbewahrung bei –80 °C gelagert. Für ein innerhalb weniger Wochen zur Weiterverarbeitung vorgesehenes Aliquot erfolgte die Lagerung bei –20 °C.

2.2.3. Kompetitive RT-PCR

Der für die nested RT-PCR verwendete Kompetitor (Standard) wurde nach einer von Celi et al. 1993 und Jin et al. 1994 beschriebenen Methode hergestellt. Bei meiner Arbeit habe ich auf einen durch A. Rötger der Arbeitsgruppe bereitgestellten Kompetitor zurückgegriffen (A. Rötger, 1995), möchte aber der Vollständigkeit halber im Folgenden kurz den Syntheseweg beschreiben.

Zunächst wurde hierzu unter Verwendung von RNeasyTM der Arbeitsvorschrift folgend die mRNA aus SK-BR-3-Kulturzellen extrahiert. Nach Umschrift in cDNA wurde mit dem äußeren Primerpaar (PC1A & PC1B) ein PCR-Produkt von 249 bp synthetisiert. Von einem Aliquot dieses PCR-Produkts wurden in zwei getrennten Ansätzen mit PC1A und mutantPrimer1 bzw. mit PC1B und mutantPrimer2 zwei sich in der mutantPrimer-Region überlappende DNA-Produkte hergestellt. In einer weiteren PCR wurden nun Aliquote dieser DNA-Produkte zusammengebracht und mit einem um eine T7-Promotor-Sequenz erweiterten äußeren Primer (PC1A) und dem zweiten äußeren Primer (PC1B) eine DNA mit T7-

Promotor-Sequenz und einer ausgetauschten Base in der Mitte des DNA-Strangs hergestellt. Nach Aufreinigung des Produktes wurde hiervon die benötigte RNA mit Hilfe einer T7-Polymerase synthetisiert.

Die exakte Konzentrationsbestimmung der Kompetitorlösung wurde mit Hilfe der UV-Spektroskopie ermittelt.

Als Ergebnis erhielt man eine RNA, die mit der Ziel-RNA bis auf die Einfügung einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bsp 143 I in der Mitte des RNA-Fragments identisch ist.

2.2.4. UV-Spektrometrie

Um mit der kompetitiven PCR quantitative Aussagen machen zu können, ist die exakte Konzentrationsbestimmung der Kompetitorlösung und der zuvor isolierten gesamt-RNA notwendig. RNA zeigt eine UV-Absorptionsbande mit einem Maximum bei 260 nm und einem Minimum bei 320 nm. Proteine, die häufig als Verunreinigung in den RNA-Präparationen auftreten, haben eine typische Absorptionsbande bei 280 nm. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ($E_{260 \text{ nm}} / E_{280 \text{ nm}}$) kann als Maß für die Reinheit der Präparation angesehen werden. Werte unter 1,7 deuten auf eine starke (mehr als 70%ige) Verunreinigung mit Proteinen hin. Die Reinheit der RNA Lösung wurde anhand des Quotienten $E_{260 \text{ nm}} / E_{280 \text{ nm}}$ abgeschätzt.

Um unspezifische Messwertverfälschungen durch Trübungen der Messlösung und andere Störgrößen zu reduzieren, wurde das Messergebnis beim Extinktionsmaximum ($E_{260 \text{ nm}}$) um das Messergebnis des Extinktionsminimums ($E_{320 \text{ nm}}$) korrigiert und nach folgender Formel die Konzentration der Messlösung bestimmt:

$$C_{\text{RNA}} = (E_{260 \text{ nm}} - E_{320 \text{ nm}}) * 40_{\text{[Faktor]}} * 30_{\text{[Verdünnung]}} \text{ (ng / } \mu\text{l)}$$

2.2.5. Umschrift in cDNA und erste PCR

2.2.5.1. SuperScript™ Preamplification System for cDNA Synthesis

Reagenzien:	
SuperScript™	GibcoBRL, Eggenstein
Rnasin® Ribonuclease Inhibitor (Rnase-Inhibitor)	Promega Corp., Heidelberg
RQ1-DNAse	Promega Corp., Heidelberg
Nucleotid-Mix (<i>GeneAmp® dNTPs</i>)	Perkin Elmer, Überlingen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen

Die aus dem Zell-Lysat extrahierte RNA wurde zusammen mit dem Kompetitor in extra dünnwandigen PCR-Gefäßen der Firma Biozym, Hess. Oldendorf, zunächst für 10 Minuten bei 37 °C mit RQ1 DNAse inkubiert um etwaige Verunreinigungen mit DNA zu beseitigen. Durch 10minütige Inkubation bei 70 °C wurde im Anschluss hieran die DNAse deaktiviert. Um möglichst ähnliche Bedingungen in den einzelnen Reaktionsansätzen zu gewährleisten und um Pipettierfehler gering zu halten, wurde dann eine Mastermix-Lösung mit allen für die Umschrift notwendigen Reagenzien mit Ausnahme des SuperScript II RT-Enzyms hergestellt und den einzelnen Reaktionsansätzen hinzu gegeben. Nach einer 5minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu jedem Reaktionsansatz 200 Units (1µl) SuperScript II RT hinzu gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur, für 50 Minuten bei 42 °C und zum Reaktionsabbruch für 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Zur Entfernung der RNA schloss sich dann noch eine 20minütige Inkubation mit jeweils 1µl RNAse H bei 37 °C an.

2.2.5.2. Erste PCR-Reaktion von cDNA-templates

Reagenzien:	
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	Promega Corp., Heidelberg
10x PCR-Reaktionspuffer (<i>Enzyme Storage Buffer A</i>)	Promega Corp., Heidelberg
25 mM MgCl ₂	Promega Corp., Heidelberg
Rnasin® Ribonuclease Inhibitor (Rnase-Inhibitor)	Promega Corp., Heidelberg
DTT (0,1 M)	Promega Corp., Heidelberg
Nucleotid-Mix (<i>GeneAmp® dNTPs</i>)	Perkin Elmer, Überlingen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen

Primer:	
Äußerer Primer 1 (PC1A)	5' -ACG GTG CAG CTG GTG ACA CAG CTT- 3'
Äußerer Primer 2 (PC1B)	5' -CGG CTG CTG GAC ATT GAC GAG ACA- 3'

In einer ersten PCR wurde ein Teil der hergestellten cDNA amplifiziert. Hierzu wurde ein separat hergestellter Mastermix einem Aliquot der cDNA zugegeben und im Anschluss hieran eine PCR im Robocycler durchgeführt.

PCR-Mastermix	
Primer PC1A und Primer PC1B	je 50 pmol
Nukleotid-Mix	4 µl (200 µM pro dNTP)
10x PCR-Reaktionspuffer	8 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
Steriles H ₂ O	ad 40 µl

Einem Volumen von 10 µl cDNA-Lösung wurden 40 µl des PCR-Mastermix zugegeben, vermischt und mit 30µl Mineralöl überschichtet, bevor sich in einem RobocyclerTM Gradient 40 der Firma Stratagene, Heidelberg, eine PCR nach folgendem Schema anschloss:

Zyklus	Denaturierung 94 °C	Annealing 56 °C	Synthese 72 °C
1. Zyklus	4 min	1 min	1 min 10 sek
2. – 41. Zyklus	1 min	1 min	1 min 10 sek
42. Zyklus	1 min	1 min	8 min

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte bis zur weiteren Verarbeitung in der 2. PCR (nested-PCR) bei 4 °C gelagert.

2.2.6. Titan™ One Tube RT-PCR System

Reagenzien:	
Titan™ One Tube RT-PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Enzym-Mix	
- RT-PCR Reaktionspuffer	
- Dithiothreit-Lösung (100 mM)	
Rnase-Inhibitor (<i>Rnasin</i> ® <i>Ribonuclease Inhibitor</i>)	Promega Corp., Heidelberg
Nucleotid-Mix (<i>GeneAmp</i> ® <i>dNTPs</i>)	Perkin Elmer, Überlingen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen

Äußere Primer:	
Äußerer Primer 1 (PC1A)	5' -ACG GTG CAG CTG GTG ACA CAG CTT- 3'
äußerer Primer 2 (PC1B)	5' -CGG CTG CTG GAC ATT GAC GAG ACA- 3'

Durchführung:

Die Umschrift der RNA templates in cDNA und die sich anschließende 1. PCR wurde mit dem Titan™ One Tube RT-PCR System direkt in einem Schritt, respektive tube durchgeführt. Um Kontamination mit RNasen zu vermeiden wurde stets mit Handschuhen gearbeitet. Um vorzeitige Aktivierung der Komponenten zu vermeiden wurden alle Reaktionskomponenten auf Eis gehalten. Um möglichst ähnliche Bedingungen in den einzelnen Reaktionsansätzen zu gewährleisten und um Pipetierfehler gering zu halten, wurden zwei Mastermix-Lösungen hergestellt. Nach Einstellung der Konzentrationsverhältnisse der template RNA und des Kompetitors in extra dünnwandigen PCR-Gefäßen der Firma Biozym, Hess. Oldendorf, wurden mit Zugabe von Mastermix 1 dem Reaktionsansatz alle notwendigen Reaktionskomponenten mit Ausnahme der Enzym-Lösung (Mastermix 2) zugegeben.

Reaktionsbedingungen

Verdünnungsreihe / Messreihe	
Kompetitor (Standard-RNA)	10 fg
RNA (template)	100 fg – 10 ng
Steriles H ₂ O	ad 12 µl

Mastermix 1	
Primer PC1A und Primer PC1B	je 50 pmol
Nukleotid-Mix	8 µl (400 µM pro dNTP)
Rnasin® Ribonuclease-Inhibitor	0,2 µl
DTT-Lösung (100 mM)	2,5 µl
Steriles H ₂ O	ad 13 µl

Mastermix 2	
5 x RT-PCR-Puffer mit Mg ²⁺	10 µl
Enzym-Mix	1 µl
Steriles H ₂ O	Ad 25 µl

Nach Zugabe und Vermischung von Mastermix 2 zum Reaktionsansatz wurde ein Endvolumen von 50 µl pro Reaktionsansatz eingestellt. Die Umschrift und Amplifikation erfolgte nach Überschichtung mit 30 µl Mineralöl in einem Robocycler™ Gradient 40 der Firma Stratagene, Heidelberg, nach folgendem Programm:

Zyklus	Denaturierung 94 °C	Annealing 56 °C	Synthese 72 °C
Umschrift		30 min	
1. Zyklus	4 min	1 min	1 min 10 sek
2. – 41. Zyklus	1 min	1 min	1 min 10 sek
42. Zyklus	1 min	1 min	8 min

Die amplifizierten DNA-Produkte wurden bis zum Einsatz in der nested-PCR bei 4 °C gelagert und danach bei –20 °C eingefroren.

2.2.7. Polymerasekettenreaktion (nested-PCR)

Reagenzien:	
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	Promega Corp., Heidelberg
10x PCR-Reaktionspuffer (<i>Enzyme Storage Buffer A</i>)	Promega Corp., Heidelberg
25 mM MgCl ₂	Promega Corp., Heidelberg
Rnase-Inhibitor (<i>Rnasin® Ribonuclease Inhibitor</i>)	Promega Corp., Heidelberg
DTT (100 mM)	Promega Corp., Heidelberg
Nucleotid-Mix (<i>GeneAmp® dNTPs</i>)	Perkin Elmer, Überlingen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen

Innere Primer:	
innerer Primer 1 (PC2C)	5' -GGA AAA CCG CGG ACG CCT GGG CT- 3'
innerer Primer 2 (PC2B)	5' -TCG GAA CGT GCT GGT CAA GAG TCC C- 3'

Ein Teil der hergestellten DNA wurde in einer zweiten PCR weiter amplifiziert. Hierzu wurden primer verwendet, die zu Sequenzen innerhalb des zuvor verwendeten Primerpaars komplementär sind. Auch hier fand das Mastermix Verfahren Anwendung.

PCR-Mastermix	
Primer PC2C und Primer PC2B	je 50 pmol
Nukleotid-Mix	4 µl (200 µM pro dNTP)
10x PCR-Reaktionspuffer	8 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
Steriles H ₂ O	ad 48 µl

Einem Volumen von 2 µl der einzelnen Reaktionsansätze aus der 1. PCR wurde 48 µl des PCR-Mastermix zugegeben, vermischt und mit 30µl Mineralöl überschichtet, bevor sich in einem Robocycler™ Gradient 40 der Firma Stratagene, Heidelberg, eine PCR nach folgendem Schema anschloß:

Zyklus	Denaturierung 94 °C	Annealing 56 °C	Synthese 72 °C
1. Zyklus	4 min	1 min	1 min 10 sek
2. – 41. Zyklus	1 min	1 min	1 min 10 sek
42. Zyklus	1 min	1 min	8 min

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte bis zur Restriktion bei 4 °C gelagert und dann bei –20 °C eingefroren.

2.2.8. Restriktion

Reagenzien:	
Restriktionsenzym (<i>Bsp143 I</i>)	Eurogentec, Seraing, Belgien

Zur Restriktion wurden 10 µl der hergestellten DNA aus der nested-PCR mit 16 µl H₂O (bidest), 3 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10 x Puffers und 1 µl Restriktionsenzym Bsp 143 I (10 U) versetzt und bei 37 °C für ca. 60 min inkubiert. Durch eine sich hieran anschließende Inkubation bei 65 °C für ca. 10 min wurde das Restriktionsenzym inaktiviert. Die aus dem Kompetitor synthetisierte DNA wurde hierdurch in zwei gleich große Fragmente von jeweils 68 bp gespalten. Die 136 bp lange, aus dem template synthetisierte DNA ließ sich in der sich anschließenden Gelelektrophorese sehr gut hiervon trennen.

2.2.9. Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien:	
5x TBE-Puffer	
NuSieve® GTG Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
SeaKem® GTG Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
6x Loading Dye	
0,25% Bromphenolblau	
40% Saccharose	
Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)	
Polaroidfilme, Typ 667	Polaroid Corporation, Offenbach

Nach erfolgter Restriktion schloss sich die Trennung der Fragmente von 136 bp und 68 bp in 3%igem Agarosegel an.

Durchführung:

Eine entsprechende Menge einer 3+1 Mischung von NuSieve® GTG Agarose und SeaKem® Agarose wurde in TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle zu einer klaren Lösung aufgekocht. Das Gel wurde sodann in 5 x 10 cm große Gelschlitten einer horizontalen Elektrophoresekammer gegossen und durch Eintauchen von 12er-Kämmen Probetaschen geformt. Die Elektrophoresekammer wurde dann bis über das ausgehärtete Gel mit TBE-Puffer aufgefüllt. Nachdem die Probetaschen mit je 10 µl der zuvor mit Loading Dye versetzten Probelösungen bzw. mit einem Längenstandard beschickt worden waren, wurde bei ca. 5 Volt/cm die Elektrophorese durchgeführt. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Bromphenolblau (Anteil des Loading Dye) entspricht ungefähr der eines Fragments von 20 bp. Nachdem das Bromphenolblau nach ca. einer Stunde aus dem Gel herausgelaufen war, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für

ca. 20 min angefärbt und anschließend für 30-60 min in demineralisiertem Wasser entfärbt. Anregung mit UV-Licht (302 nm) bewirkt die Emission eines orangefarbenen Lichtes. Mit Hilfe einer Spezialekamera wurden die Gele schließlich mit Polaroidfilmen vom Typ 667 photographiert.

2.2.10. Quantifizierung von DNA

Zunächst wurden die Photographien der Gele mit einem Flachbettscanner GT 6000 der Firma Epson mit einer Auflösung von 600 dpi als "bitmap"-Dateien eingelesen. Die densitometrische Auswertung erfolgte dann mit Hilfe des Programms Scanpack[®] der Firma Biometra, Göttingen. Zur besseren Auswertbarkeit wurde hierzu zunächst das "bitmap" invertiert und dann die optische Dichte in den zuvor festgelegten Bereichen der einzelnen "lanes" des Gels bestimmt. Über den im Densitogram erhaltenen Peaks der PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Software die entsprechenden, der Produktmenge proportionalen Flächenintegrale gebildet. Das Verhältnis der Flächenintegrale über template- und Kompetitor- Bande konnte dann berechnet werden.

2.2.11. RT-PCR mit der TaqMan[®]-Sonde

Ein neues Detektionssystem wurde mit Hilfe des 5'-Nuklease-Assay möglich. Hierdurch wurde der Einsatz von Ethiduibromid gespart. Unter Verzicht auf den Kompetitor ist diese Methode unter Zuhilfenahme einer Standard Verdünnungsreihe zumindest semiquantitativ. Der große Vorteil liegt in der verhältnismäßig einfachen und schnellen Durchführbarkeit sowie der im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Methoden deutlich reduzierten Kontaminationsgefahr.

Prinzip:

Genutzt wird bei diesem Verfahren die 5'-3'-Exonukleasefähigkeit der Taq-Polymerase. Bei dem aufeinander eingestellten System aus Primerpaar und Sonde lagert sich idealerweise die Sonde hinter dem upstream-primer (3' → 5') an das template an. Die Sonde besteht aus einem ca. 30 Basen langen Oligonukleotid das am 5' Ende mit einem fluoreszenten Reporter Farbstoff und am 3' Ende mit einem Quencher Farbstoff und mit einem blockierenden Phosphatrest gekoppelt ist. Der Phosphatrest verhindert eine Extension des 3'-Endes während der PCR. Aufgrund der räumlichen Nähe zwischen Reporter und Quencher unterdrückt bei Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge (488nm) durch einen Fluoreszenz-

Energietransfer der Quencher die Fluoreszenz des Reporters. Während der Extensionsphase der PCR kommt die Taq-Polymerase an der zuvor am Matrizen-Strang hybridisierten Sonde an und beginnt diese zu verdrängen. Die hierbei entstehende Y-förmige Sekundärstruktur aktiviert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase wodurch die Sonde hydrolysiert wird. Hierbei wird die räumliche Nähe und damit auch der Fluoreszenz-Energietransfer zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, so dass es entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt zu einem Anstieg der Fluoreszenz des Reporters kommt. Das hierbei mit jedem PCR-Zyklus ansteigende Fluoreszenzsignal des Reporters ist dabei strikt sequenzspezifisch, da nicht 100%ig bindende Sonden vom Matrizen-Strang verdrängt werden noch bevor die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert wird und nicht hybridisierte Sonden von der Taq-Polymerase auch nicht hydrolysiert werden (1).

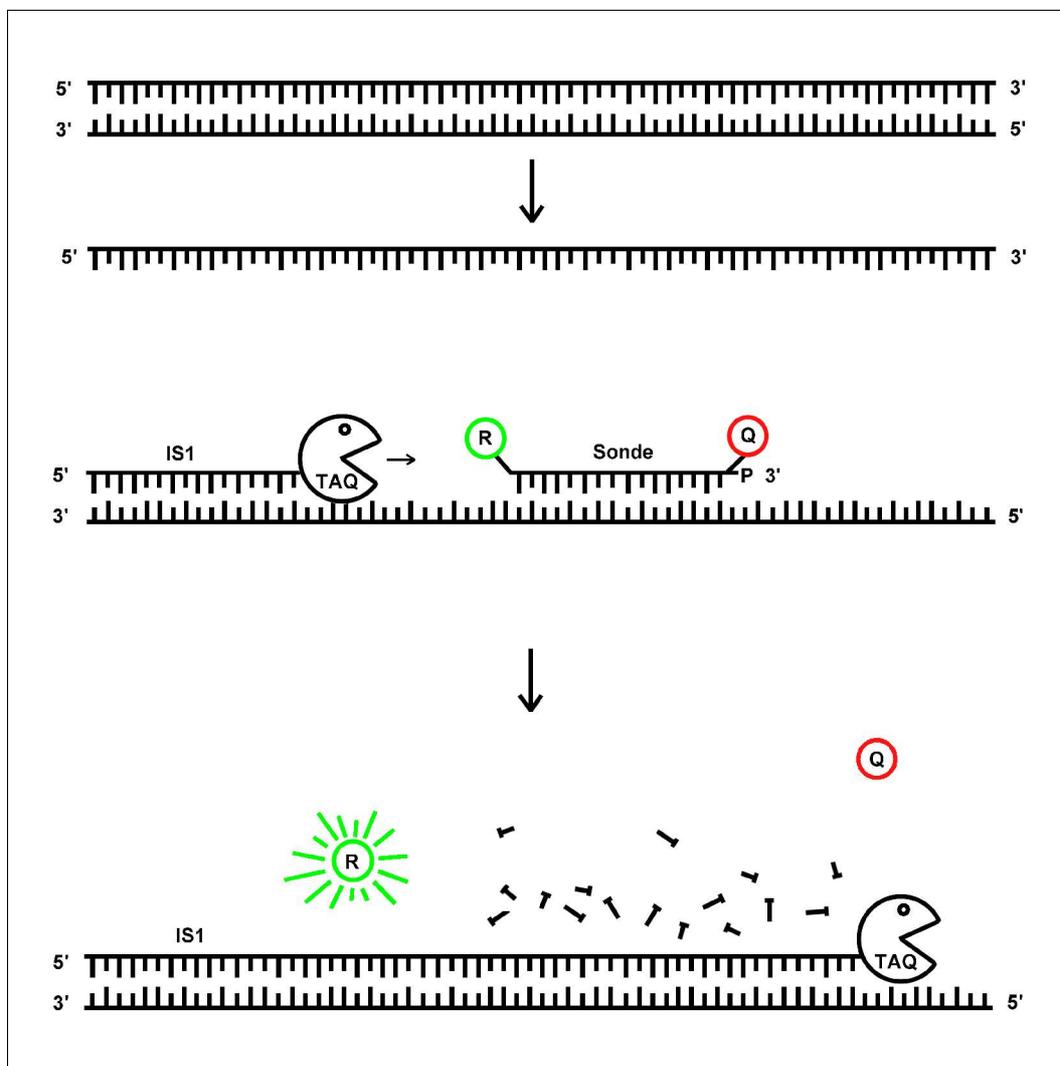


Abbildung 2.1: schematische Darstellung der TaqMan[®]-PCR

2.2.11.1. Sondendesign

Für die automatische Sondenauswahl bietet die Herstellerfirma PE Applied Biosystems die Software "Primer Express" an, welche bei der Auswahl einer geeigneten Sonde die im Folgenden beschriebenen Faktoren berücksichtigt.

2.2.11.1.1. Platzierung des Quenchers

Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher bewirkt einen von Förster (3) beschriebenen Fluoreszenz-Energietransfer dessen Effizienz umgekehrt proportional zur 6. Potenz des Abstands der beiden Fluorophoren ist. Um sicher bei jeder stattgefundenen Hydrolyse auch eine Trennung von Reporter und Quencher zu gewährleisten sollte das Oligonukleotid am 5'-Ende vom Reporter und am 3'-Ende vom Quencher begrenzt sein.

2.2.11.1.2. Mg^{2+} -Ionen-Konzentration

Unter der Vorstellung, dass aufgrund elektrostatischer Abstoßung der negativen Ladungen der Phosphatreste der Sonde diese in einer Umgebung geringer Mg^{2+} -Ionen-Konzentration eine gestreckte Form annimmt, wird so der zuvor beschriebene Fluoreszenz-Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren negativ beeinflusst. Durch Bindung von Mg^{2+} -Ionen können die elektrostatischen Abstoßungskräfte reduziert werden, so dass durch Faltung der Sonde eine relative Nähe von Reporter und Quencher erreicht wird. Die Mg^{2+} -Ionen Konzentration muss deshalb ausreichend hoch dosiert werden.

2.2.11.1.3. Basensequenz

Die Sondenflexibilität wird auch durch die Bildung von Sekundärstrukturen oder Selbstkomplementarität der Sonde beeinflusst. Ein G am 5'-Ende der Sonde kann auch nach der Sondenhydrolyse selbst einen quenchenden Einfluss an das gebundene Reporter-Fluorophor haben. Um eine stabile Hybridisierung der Sonde am Matrizen-Strang zu gewährleisten müssen folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Der GC-Gehalt der Sonde sollte etwa 50% betragen, mehr als 3 Nukleotide eines Typs in Folge sollten vermieden werden und es darf keine Komplementarität zu den beiden PCR-Primern bestehen um eine Primer-Sonden Bindung zu verhindern.

2.2.11.1.4. Reinheit der Sonde

Sind bei der Herstellung der Sonden zu viele Reporter-markierte Sonden ohne Quencher entstanden, kann deren Fluoreszenzsignal einen nachweislichen Anstieg der Reporterfluoreszenz nach Hydrolyse vom Quencher in nicht mehr messbare Bereiche verschieben.

2.2.11.1.5. Hybridisierung

Das Sonden-Matrizen-Hybrid kommt im Gegensatz zum Primer-Matrizen-Hybrid nicht zur Extension und wird nicht durch die Taq-Polymerase stabilisiert. Um die höhere Stabilität der Primer-Matrizen Bindung zu kompensieren sollte der nach der Nearest Neighbour Methode (4) bestimmte T_m der Sonde um ca. 5-10 °C über dem der PCR-Primer liegen.

Die Länge der Sonde sollte ca. 20-30 Nukleotide betragen. Wesentlich kürzere Sonden reduzieren die Spezifität, wesentlich längere Sonden bergen in sich das Problem der Sekundärstrukturausbildung, unkontrollierbare Hybridisierungstemperaturen und steigende Kosten beim Sondendesign.

2.2.11.1.6. Platzierung von Sonde und Primerpaar

Prinzipiell kann die Sonde an jeder Stelle innerhalb des durch das Primerpaar eingegrenzten Amplicons platziert werden. Hierbei sollte der Strang mit dem höheren Anteil an C als G als Gegenstück zum Sonden Oligonucleotid ausgewählt werden. Das 5'-Ende der Sonde sollte relativ nahe beim 3'-Ende des PCR-Primers platziert werden. Hierbei sollte jedoch die Prozessivität der Taq Polymerase mit einbezogen werden. Gute Erfahrungen sind hier von Seiten des Herstellers bei einem Abstand von unter 60 Basen angegeben (1).

2.2.11.1.7. Spezielle Bedingungen für die RT-PCR

Das die Zielsequenz eingrenzende Primerpaar sollte durch einen ausreichend großen Intronbereich voneinander getrennt sein. Bei Auftrennung im Agarosegel kann so mit Hilfe eines Längenstandards eindeutig verifiziert werden, ob als Ausgangs-Matrize DNA oder RNA amplifiziert worden ist.

Die bei meiner Arbeit verwendete Basensequenz des Primer IS-1 findet sich im humanen *c-erbB2*-Gen auf dem 190 Basen langen Exon 2 an Position 32 bis 51 wieder, der zum Primer IS-2 komplementäre Bereich auf dem 160 Basen langen Exon 3 an Position 112 bis 131. Die Basensequenz der verwendeten Sonde entspricht dem im humanen *c-erbB2*-Gen im Exon 2 an Position 56 bis 79 lokalisierten Bereich. Exon 2 und 3 werden durch ein 135 Basen langes Intron voneinander getrennt.

2.2.11.2. Bereitstellung der RNA

Als Matrize kommt bei diesem System sowohl isolierte RNA als auch der direkte Einsatz der zu untersuchenden Zellen in Frage. In meinen Versuchen habe ich die aus SK-BR-3-Zellen isolierte RNA sowie die SK-BR-3-Kulturzellen direkt zur Etablierung der is-RT-PCR verwendet. Um entsprechend niedrige RNA-Konzentrationen zu erhalten wurden die UV-spektrometrisch ermittelten Ausgangsmengen mit sterilem Wasser herunter verdünnt. Beim direkten Einsatz von Zellen wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Zellsuspension auf die gewünschte Zellzahl/ μ l mit sterilem Wasser verdünnt.

2.2.11.2.1. Isolierung der RNA mit RNeasy-Kit

Wie unter 2.2.2. beschrieben kann die RNA mittels des RNeasy-Kit isoliert und der RNA-Gehalt UV-spektrometrisch bestimmt werden.

2.2.11.2.2. Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Um eine RT-PCR direkt in den zu untersuchenden Zellen durchführen zu können, müssen diese zunächst für die in der PCR verwendeten Reagenzien durchgängig gemacht werden. Um auch morphologische Untersuchungen zu ermöglichen muss die Integrität der Zellmembran jedoch weitgehend erhalten bleiben. Zum einen müssen die zu untersuchenden Zellen also permeabilisiert, zum anderen aber auch fixiert und gegen weitere Auflösung der Zellmembran stabilisiert werden. Da die mRNA, also quasi die Aktivität der zu untersuchenden Zellen nachgewiesen werden soll, muss der Zellkern im Idealfall so weit fixiert werden, dass ein Nachweis von genomischer DNA nicht möglich ist.

Bei der Ermittlung der idealen Bedingungen für Permeabilisierung und Fixierung habe ich Untersuchungen mit dem Ortho PermeafixTM-Kit, dem IntraPrep-System und der Verwendung

von 3,7%igem Formalin in Kombination mit Triton X100 durchgeführt. Hierbei zeigten sich die mit Hilfe des Ortho Permeafix™-Kit und dem IntraPrep-System erzielten Ergebnisse in ihrer Reproduzierbarkeit der Kombination aus Formalin und Triton X100 deutlich überlegen. Aufgrund der etwas einfacheren Handhabung des Permeafix™-Kits, bei dem Fixierung und Permeabilisierung in einem Schritt durchgeführt werden, habe ich mich für die weiteren Untersuchungen für dieses System entschieden.

2.2.11.3. Umschrift und PCR mit dem Titan™ One Tube RT-PCR-System

Reagenzien:	
Titan™ One Tube RT-PCR-System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Enzym-Mix	
- RT-PCR-Reaktionspuffer	
- Dithiothreit-Lösung (100 mM)	
Rnase-Inhibitor (<i>Rnasin</i> ® <i>Ribonuclease Inhibitor</i>)	Promega Corp., Heidelberg
Nucleotid-Mix (<i>GeneAmp</i> ® <i>dNTPs</i>)	Perkin Elmer, Überlingen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen

Primer / Sonde:	
Primer 1 (IS-1)	5' -CCC ATA TGT CTC CCG CCT TC- 3'
Primer 2 (IS-2)	5' -CTC GTC AAT GTC CAG CAG CC- 3'
Sonde	5' -CAT CTG CCT GAC ATC CAC GGT GCA- 3'

Durchführung:

Die Durchführung entspricht im Wesentlichen dem bereits in 2.2.6. beschriebenen Prinzip.

Die TaqMan™-PCR ist jedoch nicht als nested-PCR ausgelegt. Auch wird dem Untersuchungsansatz kein Kompetitor zugegeben. Nach der kombinierten Umschrift und PCR kann das Ergebnis direkt im Fluorimeter ermittelt werden.

Auch hier erfolgen Umschrift der RNA-templates in cDNA und die sich anschließende PCR mit dem Titan™ One Tube RT-PCR-System in einem Schritt. Die generellen Arbeitsprinzipien bleiben unverändert.

Reaktionsbedingungen

Untersuchungsmaterial	
Isolierte RNA bzw. Zellsuspension	in 10 µl sterilem H ₂ O

Mastermix	
Primer IS-1 und Primer IS-2	je 20 pmol
Nukleotid-Mix	4 µl (200 µM pro dNTP)
Rnasin [®] Ribonuclease Inhibitor	0,2 µl
DTT-Lösung (100 mM)	2,5 µl
5 x RT-PCR-Puffer mit Mg ²⁺	10 µl
Enzym-Mix	1 µl
steriles H ₂ O	ad 40 µl

Nach Vermischung aller Reaktionslösungen erreicht man ein Endvolumen von 50 µl pro Reaktionsansatz. Die Umschrift und Amplifikation erfolgte nach Überschichtung mit 30 µl Mineralöl in einem Robocycler[™] Gradient 40 der Firma Stratagene, Heidelberg, nach folgendem Programm:

Zyklus	56 °C	Denaturierung 94 °C	Kombinierte Annealing und Synthese 64 °C
Umschrift	30 min		
1. Zyklus		4 min	1 min 30 sek
2. – 41. Zyklus		1 min	1 min 10 sek
42. Zyklus		1 min	8 min

Die amplifizierte DNA-Produkte wurden bis zur Messung im Fluorimeter bei 4 °C gelagert.

2.2.11.4. Detektion am Fluorimeter

In eine mit einer magnetischen Rührkomponente ausgestatteten Küvette gefüllt werden die zu untersuchenden Proben im Fluorimeter durch Bestrahlung mit 488 nm angeregt. Im Gerät werden dann die Emissionswellenlängen dreimal gemessen und der Durchschnittswert ermittelt.

Die folgenden Farbstoffe finden allgemein Verwendung beim Design der TaqMan®-Sonde.

Farbstoff	Chemische Bezeichnung	Typ	Anregung (nm)	Emission (nm)
FAM	6-Carboxy-fluorescein	Reporter	488	518
TET	Tetrachloro-6-carboxy-fluorescein	Reporter	488	538
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein	Reporter	488	554
HEX	Hexachloro-6-carboxy-fluorescein	Reporter	488	556
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	Passiver Referenzfarbstoff	488	602
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin	Quencher	488	582

Für meine Arbeit verwendete ich einen FAM-Reporter und den standardmäßig verwendeten TAMRA-Quencher. Im Gerät wurden also die Emissionswellenlängen bei 518nm und 582nm gemessen. Danach wurde der Quotient aus den Fluoreszenzstärken von Reporter und Quencher ermittelt. Durch Vergleich mit einer Standardreihe kann dann auf die Ausgangsmenge von eingesetzter Matrizen-DNA zurück gerechnet werden.

2.2.12. Zellaufreinigung von Blutproben mittels Dichtegradient

Zur Verbesserung der Spezifität wurden die im Rahmen der Untersuchung von Patienten und Probanden entnommenen Blutproben vor der RNA-Isolation mit Hilfe eines Dichtegradienten aufgetrennt. Hierzu wurde der laborintern bereits etablierte Gradient aus den zwei übereinandergeschichteten hyperosmolaren Dichtemedien PolymorphPrep® (Dichte (d) = 1.113 g/ml, Osmolalität (osm) = 460 mosM) zur Granulozytentrennung und Nycoprep® 1.068 (d = 1.068 g/ml, osm = 335 mosM) zur Monozyten- und Lymphozytentrennung verwendet. Die zur Trennung verwendeten Polypropylen-Röhrchen wurden zunächst für etwa 30 Minuten mit 1%igem fetalem Kälberserum (FCS) in PBS abgesättigt. Nach Abgießen des FCS wurden die Röhrchen zunächst mit 3 ml PolymorphPrep® befüllt und danach unter Sichtkontrolle vorsichtig mit 3 ml Nycoprep® 1.068 überschichtet. Der so hergestellte Dichtegradient wurde dann noch vorsichtig mit 5 ml des zu untersuchenden EDTA-Blutes überschichtet, verschlossen und für 20 Minuten bei 2000 UpM unter Raumtemperatur zentrifugiert.

Grob betrachtet ergab sich hierdurch eine Dreischichtung der einzelnen Blutbestandteile. Der oben befindliche Plasmaüberstand und die unten abgesetzten Erythrozyten wurden im weiteren Verlauf nicht weiter verwendet. Die im Mittelteil des Dichtegradienten befindliche Zellfraktion wurde mit Hilfe einer Spritze und einer 18G-Kanüle abgezogen und zur weiteren

Verwendung in PBS gewaschen. Hierzu wurde die Zellsuspension in PBS aufgeschwemmt und für 20 Minuten bei 2000 UpM unter Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes erneut in PBS aufgeschwemmt und für 20 Minuten bei 2000 UpM unter Raumtemperatur zentrifugiert. Schließlich wurde das Zellpellet in 500-1000 μ l PBS aufgeschwemmt und der weiteren Verwertung zugeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Kompetitive PCR an isolierter RNA

3.1.1. Standard Reihe (SuperScript™ Preamplification System)

Zur Einstellung der Reaktionsbedingungen wurde eine Verdünnungsreihe mit Kompetitor-RNA und isolierter RNA aus SK-BR-3-Kulturzellen mit nachweislich erhöhter ErbB2 Expression hergestellt. Hierbei wurden definierte Mengen der zuvor densitometrisch bestimmten RNA dem folgenden Schema entsprechend eingesetzt.

Cup	RNA-Isolat aus SK-BR-3-Zellen	RNA-Kompetitor	Anmerkung
1	500 pg	-	Positiv Kontrolle
2	2 ng	500 atg	
3	1 ng	500 atg	
4	500 pg	500 atg	
5	200 pg	500 atg	
6	100 pg	500 atg	
7	50 pg	500 atg	
8	10 pg	500 atg	
9	5 pg	500 atg	
10	-	500 atg	Standard Kontrolle
11	-	-	Negativ Kontrolle

Die einzelnen RNA-Mengen wurden durch Verdünnung mit DEPC-Wasser aus einer höher konzentrierten „Stammlösung“ von 10 ng/μl (RNA-Isolat aus SK-BR-3 Zellen) bzw. von 100 pg/μl (RNA-Kompetitor) hergestellt. Die verwendeten Reaktionsbedingungen entsprechen den unter 2.2.5. ff angegebenen.

Reaktion	Beschreibung	Abweichungen
cDNA-Synthese	2.2.5.1.	-
1. PCR	2.2.5.2.	-
nested-PCR	2.2.7.	-
Restriktion	2.2.8.	-
Agarose-Gel-Elektrophorese	2.2.9.	-
DNA-Quantifizierung	2.2.10.	-

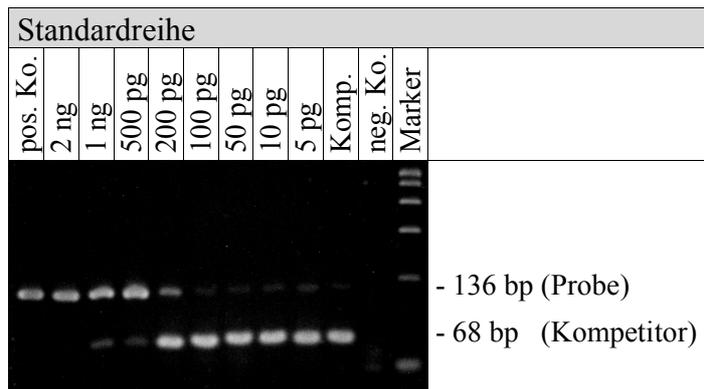


Abbildung 3.1: Standardreihe

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Die DNA-Produkte sind in der Abbildung von oben nach unten gelaufenen. Die kürzeren 68 bp Produkte gehen durch enzymatisches Schneiden mittels des Restriktionsenzym Bsp 143 I aus den von den Kompetitoren gebildeten Produkten hervor. Sie wandern im elektrischen Feld während der Elektrophorese deutlich schneller als die ungeschnittenen 136 bp langen Produkte, die aus der Amplifikation des template, also in diesem Fall dem SK-BR-3-RNA-Isolat hervorgehen. Die kürzeren 68 bp Produkte sind also weiter unten, die längeren 136 bp Produkte weiter oben im Bild. Unter gleich bleibender Zugabe von Kompetitor (500 atg RNA) kann die relative Zunahme der in unterschiedlicher Konzentration (2 ng – 5 pg RNA) eingesetzten SK-BR-3-RNA-Isolation beobachtet werden. Es findet sich ein „Umschlagspunkt“ zwischen 500 pg und 200 pg eingesetzter template-Menge. Hier ist auch die Nachweisgrenze des Systems zu sehen.

3.1.2. inverse Standard-Reihe (SuperScript™ Preamplification System)

Um die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Standard-Reihen zu verifizieren wurde in einer weiteren Verdünnungsreihe einer gleich bleibenden Menge zuvor densitometrisch bestimmter template-RNA, also RNA-Isolat aus SK-BR-3-Kulturzellen, nach dem in der folgenden Tabelle dargestellten Schema, eine variable Menge der Kompetitor-RNA zugesetzt.

Cup	RNA-Isolat aus SK-BR-3-Zellen	RNA-Kompetitor	Anmerkung
1	-	500 atg	Standard Kontrolle
2	300 pg	1500 atg	
3	300 pg	1000 atg (= 1 fg)	
4	300 pg	500 atg	
5	300 pg	250 atg	
6	300 pg	100 atg	
7	300 pg	50 atg	
8	300 pg	-	Positiv Kontrolle
9	-	-	Negativ Kontrolle

Die einzelnen RNA-Mengen wurden wiederum durch Verdünnung mit DEPC-Wasser aus einer höher konzentrierten „Stammlösungen“ hergestellt und entsprechend der unter 2.2.5. ff angegebenen Reaktionsbedingungen verarbeitet (siehe 3.1.1).

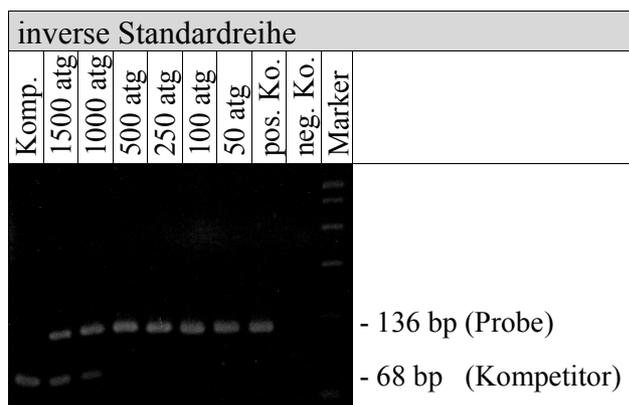


Abbildung 3.2: inverse Standardreihe

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Die kürzeren 68 bp Produkte sind in der Abbildung weiter unten, die längeren 136 bp Produkte weiter oben dargestellt. Die densitometrische Auswertung (siehe 2.2.10.) der Banden ergab folgendes Ergebnis:

Lane	RNA Isolat aus SKBr3-Zellen	RNA-Kompetitor	% Anteil	Ratio
2	300 pg	1500 atg	65,0 / 41,0	1,37
3	300 pg	1000 atg (= 1 fg)	65,7 / 29,5	2,23
4	300 pg	500 atg	89,0 / 2,9	30,69

Bei der inversen Standardreihe findet sich bei konstanter template-Menge von 300 pg eingesetztem RNA-Isolat von SK-BR-3-Zellen ein „Umschlagspunkt“ oberhalb von 1500 atg

eingesetzter Kompetitor-RNA-Menge. Ein Grund für dieses auf den ersten Blick sehr von der Standardreihe abweichende Ergebnis ist die logarithmische Abhängigkeit von Ausgangsmenge und Endprodukt. Kleinste Abweichungen in der eingesetzten Konzentration können durch die Amplifikation bei der PCR bereits deutliche Auswirkungen haben. Eine weitere Möglichkeit stellen Ungenauigkeiten beim Pipetiervorgang dar. Wiederholt durchgeführte Standardreihen und inverse Standardreihen zeigten unter den jeweils gleich bleibenden Versuchsbedingungen prinzipiell in sich vergleichbare Ergebnisse. Es kam jedoch sehr häufig zum Ausfall einzelner Versuchsansätze sowie häufig zu fehlerhaften Kontrollen.

3.1.3. Standard Reihe (Titan™ One Tube RT-PCR-System)

Aufgrund der multiplen Arbeitsschritte und der hierdurch erhöhten Kontaminationsgefahr wurde für die Durchführung reproduzierbarer Ergebnisse ein neues System notwendig um die Störquellen möglichst weitgehend zu reduzieren. Durch die Zusammenfassung von Umschrift und 1. PCR in einem Versuchsansatz war eine deutliche Verbesserung zum vorher etablierten System gegeben. Analog zu den in 3.1.1. und 3.1.2. beschriebenen Standardreihen und inversen Standardreihen wurden nun unter Verwendung des Titan™ One Tube RT-PCR-Systems vergleichbare Verdünnungsreihen durchgeführt. Das folgende Schema gibt Auskunft über die in der Standard Verdünnungsreihe eingesetzten RNA-Mengen.

Cup	RNA-Isolat aus SK-BR-3-Zellen	RNA-Kompetitor	Anmerkung
1	500 pg	-	Positiv Kontrolle
2	2 ng	500 atg	
3	1 ng	500 atg	
4	500 pg	500 atg	
5	200 pg	500 atg	
6	100 pg	500 atg	
7	50 pg	500 atg	
8	10 pg	500 atg	
9	5 pg	500 atg	
10	-	500 atg	Standard Kontrolle
11	-	-	Negativ Kontrolle

Die einzelnen RNA-Mengen wurden wie zuvor beschrieben durch Verdünnung mit DEPC-Wasser aus einer höher konzentrierten „Stammlösung“ hergestellt. Die verwendeten Reaktionsbedingungen entsprechen den unter 2.2.6. ff angegebenen.

Reaktion	Beschreibung	Abweichungen
cDNA-Synthese & 1. PCR	2.2.6.	-
nested-PCR	2.2.7.	-
Restriktion	2.2.8.	-
Agarose-Gel-Elektrophorese	2.2.9.	-
DNA-Quantifizierung	2.2.10.	-

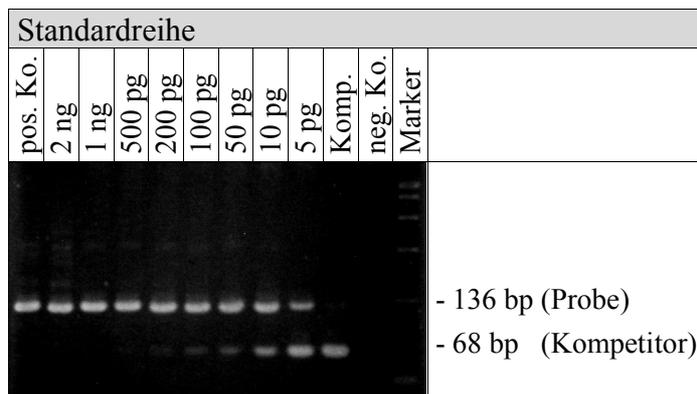


Abbildung 3.3: Standardreihe

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Die kürzeren 68 bp Produkte sind in der Abbildung weiter unten, die längeren 136 bp Produkte weiter oben dargestellt. Die densitometrische Auswertung (siehe 2.2.10.) der Banden ergab folgendes Ergebnis:

Lane	RNA-Isolat aus SK-BR-3-Zellen	RNA-Kompetitor	% Anteil	Ratio
1	500 pg	-	92,8 / -	-
2	2 ng	500 atg	91,7 / -	-
3	1 ng	500 atg	94,9 / -	-
4	500 pg	500 atg	92,6 / -	-
5	200 pg	500 atg	84,3 / 6,1	13,8
6	100 pg	500 atg	77,4 / 11,5	6,7
7	50 pg	500 atg	77,0 / 17,0	4,5
8	10 pg	500 atg	63,4 / 33,9	1,9
9	5 pg	500 atg	36,6 / 55,1	0,66
10	-	500 atg	1,7 / 92,1	0,02

Es findet sich ein „Umschlagspunkt“ zwischen 10 pg (\approx 1 Zelle) und 5 pg eingesetzter template-Menge. Mit dem hier beschriebenen System sind also wesentlich geringere Ausgangsmengen bestimmbar. Die bei wiederholter Durchführung erzielten Ergebnisse waren zudem wesentlich konsistenter als bei der unter 3.1.1. beschriebenen Methode.

3.1.4. inverse Standard Reihe (Titan™ One Tube RT-PCR System)

Auch für die mit dem Titan™ One Tube RT-PCR-System erstellten Standardreihen erfolgte eine entsprechende Verifizierung analog zu der in 3.1.2. dargestellten Vorgehensweise. Die folgende Tabelle gibt die eingesetzten Mengen wieder:

Cup	RNA-Isolat aus SK-BR-3-Zellen	RNA-Kompetitor	Anmerkung
1	-	500 atg	Standard Kontrolle
2	20 pg	2500 atg	
3	20 pg	1500 atg (= 1,5 fg)	
4	20 pg	750 atg	
5	20 pg	500 atg	
6	20 pg	250 atg	
7	20 pg	-	Positiv Kontrolle
8	-	-	Negativ Kontrolle

Die einzelnen RNA-Mengen wurden wiederum durch Verdünnung mit DEPC-Wasser aus einer höher konzentrierten „Stammlösungen“ hergestellt und entsprechend den unter 2.2.6. ff angegebenen Reaktionsbedingungen verarbeitet (siehe 3.1.2.).

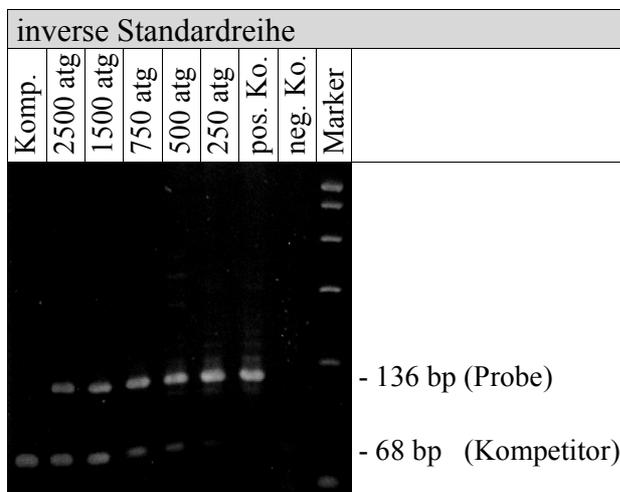


Abbildung 3.4: inverse Standardreihe

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Die kürzeren 68 bp Produkte sind in der Abbildung weiter unten, die längeren 136 bp Produkte weiter oben dargestellt. Die densitometrische Auswertung (siehe 2.2.10.) der Banden ergab folgendes Ergebnis:

Lane	RNA-Isolat aus SK-BR-3-Zellen	RNA-Kompetitor	% Anteil	Ratio
2	20 pg	2500 atg (2,5 fg)	44,3 / 44,8	0,99
3	20 pg	1500 atg (1,5 fg)	45,5 / 44,4	1,00
4	20 pg	750 atg	57,2 / 26,8	2,13
5	20 pg	500 atg	56,6 / 18,6	3,04
6	20 pg	250 atg	66,8 / 6,7	9,97
7	20 pg	-	69,3 / 5,9	11,7

Bei der inversen Standardreihe findet sich bei konstanter template-Menge von 20 pg eingesetztem RNA-Isolat von SK-BR-3-Zellen ein „Umschlagspunkt“ zwischen 2,5 fg und 1,5 fg eingesetzter Kompetitor-RNA-Menge. Dieses Ergebnis ist konform zu den unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführten Ergebnissen der Standardreihe (3.1.3.). Auch wiederholte Durchführungen kamen zu vergleichbaren Ergebnissen. Das gewählte System ist somit dem unter 3.1.1. bzw. 3.1.2. beschriebenen System überlegen.

3.1.5. Modifikation der Zykluszahl in der Standard Reihe

Das unter 3.1.3. beschriebene System wurde in Anlehnung an die unter 3.1.1. beschriebene Standardreihe entwickelt. Um den Plateau-effekt zu minimieren und somit die Effizienz des Systems weiter zu verbessern wurden im weiteren Verlauf die Zykluszahlen reduziert. Weiterhin wurde die Elongationstemperatur um 4 °C herabgesetzt. Mit geänderten RNA-Ausgangsmengen wurde dann erneut eine Standardreihe durchgeführt. Das folgende Schema gibt Auskunft über die in der Standard-Verdünnungsreihe eingesetzten RNA-Mengen.

Cup	RNA-Isolat aus SK-BR-3-Zellen	RNA-Kompetitor	Anmerkung
1	5 ng	-	Positiv Kontrolle
2	10 ng	10 fg	
3	1 ng	10 fg	
4	100 pg	10 fg	
5	10 pg	10 fg	
6	1000 fg	10 fg	
7	100 fg	10 fg	
8	-	10 fg	Standard Kontrolle
9	-	-	Negativ Kontrolle

Die einzelnen RNA-Mengen wurden wie zuvor beschrieben durch Verdünnung mit DEPC-Wasser aus einer höher konzentrierten „Stammlösung“ hergestellt. Die verwendeten

Reaktionsbedingungen entsprechen mit Ausnahme der in der folgenden Tabelle angegebenen Abweichungen den unter 2.2.6. ff angegebenen.

Reaktion	Beschreibung	Abweichungen
cDNA Synthese & 1. PCR	2.2.6.	Annealing: 27 Zyklen Elongation: 68 °C
nested-PCR	2.2.7.	Annealing: 30 Zyklen
Restriktion	2.2.8.	-
Agarose Gel Elektrophorese	2.2.9.	-
DNA Quantifizierung	2.2.10.	-

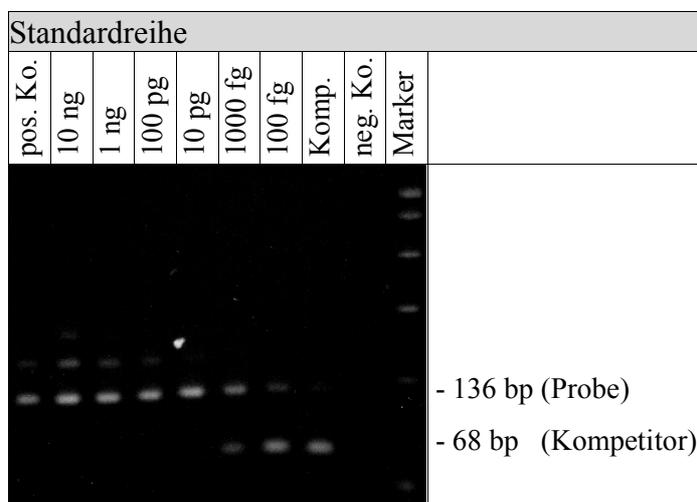


Abbildung 3.5: Standardreihe

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Die kürzeren 68 bp Produkte sind in der Abbildung weiter unten, die längeren 136 bp Produkte weiter oben dargestellt. Die densitometrische Auswertung (siehe 2.2.10.) der Banden ergab folgendes Ergebnis:

Lane	RNA-Isolat aus SK-BR-3-Zellen	RNA-Kompetitor	% Anteil	Ratio
1	5 ng	-	53,9 / -	-
2	10 ng	10 fg	60,4 / -	-
3	1 ng	10 fg	70,0 / -	-
4	100 pg	10 fg	65,1 / -	-
5	10 pg	10 fg	71,3 / -	-
6	1000 fg	10 fg	51,4 / 32,5	1,58
7	100 fg	10 fg	15,9 / 73,1	0,22
8	-	10 fg	7,3 / 86,1	0,08

Die Integrale der ersten 5 Reihen waren lediglich über den Banden der längeren 136 bp Produkte auswertbar. Es findet sich ein „Umschlagspunkt“ zwischen 1000 fg (1 pg) und 100 fg eingesetzter template-Menge. Dass sich über der Kompetitor-Kontrolle noch ein Integral über den längeren Fragmenten ableiten lässt, liegt wahrscheinlich daran, dass die enzymvermittelte Spaltung mittels des Restriktionsenzym Bsp 143 I wahrscheinlich nur unvollständig stattgefunden hat bzw. ein Gleichgewicht zwischen Ausgangs- und Endprodukt besteht. Trotz erhöhter Ausgangsmenge von RNA-Kompetitor ließ sich mit dem modifizierten System noch mal eine um etwa eine 10er Potenz geringere Ziel-RNA-Menge bestimmen.

3.1.6. Probanden und Patienten

Exemplarisch wurde von Patientinnen mit bekanntem Tumorleiden sowie von gesunden LabormitarbeiterInnen aus einer Blutprobe RNA isoliert und mit der unter 3.1.5. beschriebenen Methode untersucht.

Die Blutproben wurden wie unter 2.2.12. beschrieben vor der RNA-Isolation mit Hilfe eines Dichtegradienten aufgetrennt. Von der so erhaltenen, konzentrierten Zellsuspension wurde dann mit der unter 2.2.2. beschriebenen Methode die RNA isoliert und die so gewonnene RNA-Menge mit der unter 2.2.4. beschriebenen Methode bestimmt.

Entsprechend den unter 3.1.5. beschriebenen PCR-Bedingungen erfolgte dann die Untersuchung der Proben.

3.1.6.1. Negativ-Kontrollen

Die Untersuchung von gesunden Probanden wurde unter Verwendung des TitanTM One Tube RT-PCR-System entsprechend den unter 3.1.5. beschriebenen PCR-Bedingungen durchgeführt. Das folgende Schema gibt Auskunft über die unter Verwendung von DEPC-Wasser hergestellten RNA-Konzentrationen. Analog zu der unter 3.1.5. beschriebenen Standardreihe erfolgte auch bei der Untersuchung der Probanden-RNA eine Verdünnungsreihe, um den Umschlagspunkt der Bandenintensität feststellen zu können.

Cup	RNA-Isolat	RNA-Kompetitor	Anmerkung
1	500 pg SK-BR-3-RNA	-	Positiv Kontrolle
2	10 ng (Proband A)	10 fg	
3	1 ng (Proband A)	10 fg	
4	100 pg (Proband A)	10 fg	
5	10 pg (Proband A)	10 fg	
6	10 ng (Proband B)	10 fg	
7	1 ng (Proband B)	10 fg	
8	100 pg (Proband B)	10 fg	
9	10 pg (Proband B)	10 fg	
10	-	10 fg	Standard Kontrolle
11	-	-	Negativ Kontrolle

Die verwendeten Reaktionsbedingungen entsprechen mit Ausnahme der in der folgenden Tabelle angegebenen Abweichungen den unter 2.2.6. ff angegebenen.

Reaktion	Beschreibung	Abweichungen
cDNA-Synthese & 1. PCR	2.2.6.	Annealing: 27 Zyklen Elongation: 68 °C
nested-PCR	2.2.7.	Annealing: 30 Zyklen
Restriktion	2.2.8.	-
Agarose-Gel-Elektrophorese	2.2.9.	-
DNA-Quantifizierung	2.2.10.	-

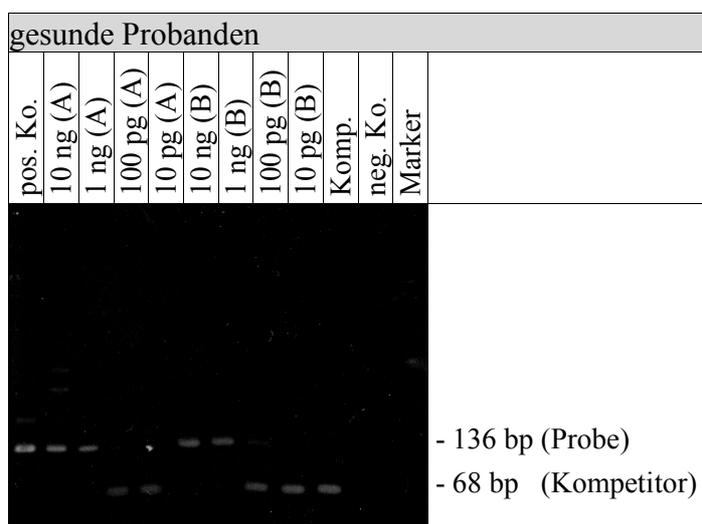


Abbildung 3.6: negative Kontrollen (gesunde Probanden)

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Die kürzeren 68 bp Produkte sind in der Abbildung weiter unten, die längeren 136 bp Produkte weiter oben dargestellt. Der Marker ist auf diesem Gel nicht mit dargestellt. Die densitometrische Auswertung (siehe 2.2.10.) der Banden ergab folgendes Ergebnis:

Lane	RNA-Isolat	RNA-Kompetitor	% Anteil	Ratio
1	5 ng (SK-BR-3)	-	77,8 / -	-
2	10 ng (Proband A)	10 fg	77,8 / -	-
3	1 ng (Proband A)	10 fg	85,0 / -	-
4	100 pg (Proband A)	10 fg	12,1 / 78,9	0,15
5	10 pg (Proband A)	10 fg	xx,x / 38,8 *	*
6	10 ng (Proband B)	10 fg	75,6 / -	-
7	1 ng (Proband B)	10 fg	58,9 / 5,8	10,2
8	100 pg (Proband B)	10 fg	18,6 / 58,2	0,32
9	10 pg (Proband B)	10 fg	7,0 / 68,0	0,10
10	-	10 fg	4,2 / 80,4	0,05

* Auf dem Gel befand sich leider im Bereich der 136 bp Bande ein fluoreszierendes Partikelchen, weshalb die densitometrische Auswertung hier nicht möglich war. Unter 3.1.6.2. ist RNA vom gleichen Probanden noch einmal dargestellt.

Bei beiden Probanden treten die Banden des Kompetitors erst bei einer RNA-Konzentration von 100 pg und weniger auf. Bei höheren RNA-Ausgangs-Konzentrationen sind bei beiden Probanden deutliche ErbB2-Banden feststellbar!

Dies gibt einen Hinweis darauf, dass auch bei gesunden Menschen eine Expression von ErbB2 vorhanden zu sein scheint. Zur Verifizierung ist jedoch die Untersuchung eines wesentlich größeren Kollektivs notwendig, als dies im Rahmen der Methoden-Validierung durchgeführt wurde.

3.1.6.2. Bluteinmischversuch

Nachdem bei der Untersuchung von gesunden Probanden (siehe 3.1.6.1.) regelmäßig ErbB2-Banden nachweisbar waren, musste festgestellt werden, ob bei Vorhandensein von ErbB2 exprimierenden Tumorzellen im Blut mit der unter 3.1.5. beschriebenen Methode überhaupt ein signifikanter Unterschied nachweisbar war.

Hierzu wurde dem Blut eines gesunden Probanden (Proband A aus 3.1.6.1.) eine mittels Zählkammer bestimmte Anzahl von SK-BR-3-Zellen zugesetzt. Das vom Probanden entnommene Blut wurde gepoolt und auf 5 Fraktionen zu je 5 ml aufgeteilt. Eine Fraktion

blieb unverändert als „negative“ Kontrolle. Die anderen Fraktionen wurden mit 10, 100, 1.000 bzw. 10.000 SK-BR-3-Kulturzellen versetzt. Schließlich wurden alle Fraktionen entsprechend der unter 2.2.12. beschriebenen Methode mittels Dichtegradienten aufgetrennt und die RNA mit der unter 2.2.2. beschriebenen Methode isoliert.

Die Untersuchung wurde dann unter Verwendung des Titan™ One Tube RT-PCR-Systems entsprechend den unter 3.1.5. beschriebenen PCR-Bedingungen durchgeführt.

Das folgende Schema gibt Auskunft über die unter Verwendung von DEPC-Wasser hergestellten RNA-Konzentrationen.

Cup	RNA-Isolat	RNA-Kompetitor	Anmerkung
1	500 pg SK-BR-3-RNA	-	Positiv Kontrolle
2	10 ng (Proband A)	10 fg	
3	1 ng (Proband A)	10 fg	
4	100 pg (Proband A)	10 fg	
5	10 pg (Proband A)	10 fg	
6	10 ng (Proband A + 10 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
7	1 ng (Proband A + 10 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
8	100 pg (Proband A + 10 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
9	10 pg (Proband A + 10 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
10	10 ng (Proband A + 100 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
11	1 ng (Proband A + 100 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
12	100 pg (Proband A + 100 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
13	10 pg (Proband A + 100 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
14	10 ng (Proband A + 1.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
15	1 ng (Proband A + 1.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
16	100 pg (Proband A + 1.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
17	10 pg (Proband A + 1.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
18	10 ng (Proband A + 10.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
19	1 ng (Proband A + 10.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
20	100 pg (Proband A + 10.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
21	10 pg (Proband A + 10.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	
22	10 ng RNA aus MDA-Zellen	10 fg	
23	1 ng RNA aus MDA-Zellen	10 fg	
24	100 pg RNA aus MDA-Zellen	10 fg	
25	10 pg RNA aus MDA-Zellen	10 fg	
26	-	10 fg	Standard Kontrolle
27	-	-	Negativ Kontrolle

Die verwendeten Reaktionsbedingungen entsprechen mit Ausnahme der in der folgenden Tabelle angegebenen Abweichungen den unter 2.2.6. ff angegebenen.

Reaktion	Beschreibung	Abweichungen
cDNA Synthese & 1. PCR	2.2.6.	Annealing: 27 Zyklen Elongation: 68 °C
nested-PCR	2.2.7.	Annealing: 30 Zyklen
Restriktion	2.2.8.	-
Agarose Gel Elektrophorese	2.2.9.	-
DNA Quantifizierung	2.2.10.	-

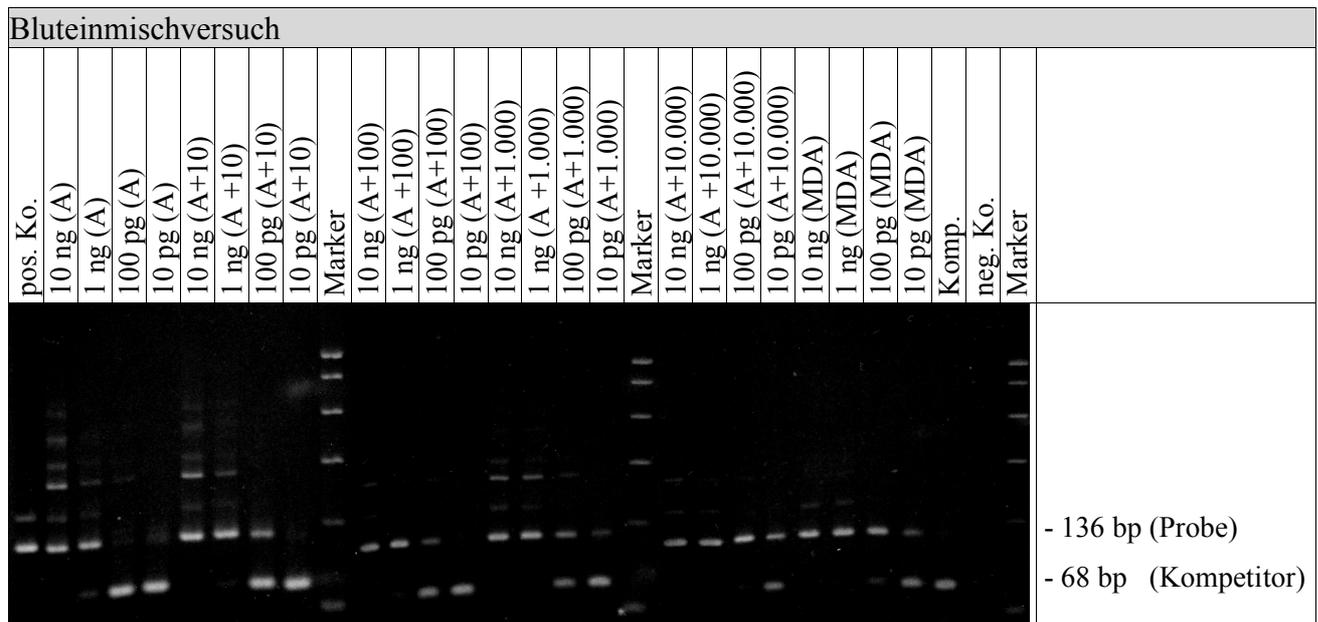


Abbildung 3.7: Bluteinmischversuch

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Die kürzeren 68 bp Produkte sind in der Abbildung weiter unten, die längeren 136 bp Produkte weiter oben dargestellt. Die densitometrische Auswertung (siehe 2.2.10.) der Banden ergab folgendes Ergebnis:

Lane	RNA-Isolat	RNA-Kompetitor	% Anteil	Ratio
1	5 ng (SK-BR-3)	-	99,5	-
2	10 ng (Proband A)	10 fg	99,9	-
3	1 ng (Proband A)	10 fg	81,4 / 15,0	5,43
4	100 pg (Proband A)	10 fg	3,9 / 89,4	0,04
5	10 pg (Proband A)	10 fg	10,9 / 83,2	0,13
6	10 ng (Proband A + 10 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	95,3 / -	-
7	1 ng (Proband A + 10 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	87,0 / 8,6	10,1
8	100 pg (Proband A + 10 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	30,0 / 63,0	0,48

9	10 pg (Proband A + 10 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	9,7 / 83,1	0,12
11	10 ng (Proband A + 100 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	88,3 / -	-
12	1 ng (Proband A + 100 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	83,1 / 10,0	8,31
13	100 pg (Proband A + 100 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	26,5 / 67,4	0,39
14	10 pg (Proband A + 100 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	4,2 / 87,5	0,05
15	10 ng (Proband A + 1.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	88,3 / -	-
16	1 ng (Proband A + 1.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	88,8 / 3,6	24,7
17	100 pg (Proband A + 1.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	39,1 / 56,7	0,69
18	10 pg (Proband A + 1.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	17,0 / 75,7	0,22
20	10 ng (Proband A + 10.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	77,6 / -	-
21	1 ng (Proband A + 10.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	82,4 / -	-
22	100 pg (Proband A + 10.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	79,0 / 6,9	11,4
23	10 pg (Proband A + 10.000 SK-BR-3-Zellen)	10 fg	40,0 / 48,7	0,82
24	10 ng RNA aus MDA-Zellen	10 fg	87,2 / -	-
25	1 ng RNA aus MDA-Zellen	10 fg	75,7 / 2,3	-
26	100 pg RNA aus MDA-Zellen	10 fg	68,0 / 18,0	3,78
27	10 pg RNA aus MDA-Zellen	10 fg	25,4 / 64,2	0,40
28	-	10 fg	4,3 / 88,2	0,05

Bei dem Probanden treten nun im Gegensatz zu den Ergebnissen aus 3.1.6.1. die Banden des Kompetitors bereits bei einer RNA-Konzentration von 1 ng und weniger auf.

Weiterhin sind ErbB2-Banden zumindest schwach bis zu einer Konzentration von 10 pg vorhanden (Lane 2-5).

Unter Beimischung von 10 (Lane 6-9) bzw. 100 (Lane 11-14) SK-BR-3-Zellen ist kein signifikanter Unterschied zu dem Bandenmuster des Probandenblutes ohne Beimischung von SK-BR-3-Zellen zu erkennen.

Unter Beimischung von 1.000 SK-BR-3-Zellen (Lane 15-18) ist bereits eine deutliche Abnahme der Kompetitor-Bande erkennbar. Densitometrisch ausgewertet drückt sich das in einer jeweils höheren Ratio aus.

Unter Beimischung von 10.000 Zellen (Lane 20-23) ist eine Kompetitor-Bande bei 1 ng Ausgangs-RNA nicht mehr erkennbar. Die Ratio bei 100 pg Ausgangs-RNA ist hier im Vergleich zu allen anderen um mindestens das 15fache erhöht.

Auch beim Einsatz von aus MDA-Kulturzellen gewonnener RNA ist eine Kompetitor-Bande erst ab einer Konzentration unter 1 ng erkennbar.

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied bei einer Zellzahl von 10.000 SK-BR-3-Zellen auf 5 ml EDTA-Blut mit der unter 3.1.5. beschriebenen Methode nachweisbar ist. Geht man von durchschnittlich 5.000 weißen Blutkörperchen pro μ l

aus, ergibt sich rein rechnerisch durch eine SK-BR-3-Zelle unter 2.500 weißen Blutkörperchen eine signifikante Erhöhung der nachgewiesenen ErbB2-Expression.

Aus denselben RNA-Isolaten, die in diesem Versuchsaufbau eingesetzt worden sind, wurde auch noch ein weiterer Versuch unter Einsatz der TaqMan™ PCR (siehe 2.2.11. und 3.2.2.3.) durchgeführt.

3.1.6.3. Patienten

Um das unter 3.1.5. beschriebene RT-PCR-System auf seine praktische Anwendbarkeit hin zu überprüfen, erfolgte exemplarisch die Untersuchung von insgesamt 9 EDTA-Blutproben von unterschiedlichen Patientinnen.

Die Blutproben der Patientinnen wurden entsprechend der unter 2.2.12. beschriebenen Methode mittels Dichtegradienten aufgetrennt und die RNA mit der unter 2.2.2. beschriebenen Methode isoliert.

Die Untersuchung wurde dann unter Verwendung des Titan™ One Tube RT-PCR-Systems entsprechend den unter 3.1.5. beschriebenen PCR-Bedingungen durchgeführt.

Unter Verwendung von DEPC-Wasser wurden wie bisher (siehe 3.1.6.1.) jeweils 4 Verdünnungsstufen in 10er Potenzschritten (10 ng / 1 ng / 100 pg / 10 pg) pro zu untersuchender Probe angefertigt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchung von 4 Patienten genauer dargestellt.

Die verwendeten Reaktionsbedingungen entsprechen mit Ausnahme der in der folgenden Tabelle angegebenen Abweichungen den unter 2.2.6. ff angegebenen.

Reaktion	Beschreibung	Abweichungen
cDNA Synthese & 1. PCR	2.2.6.	Annealing: 27 Zyklen Elongation: 68 °C
nested-PCR	2.2.7.	Annealing: 30 Zyklen

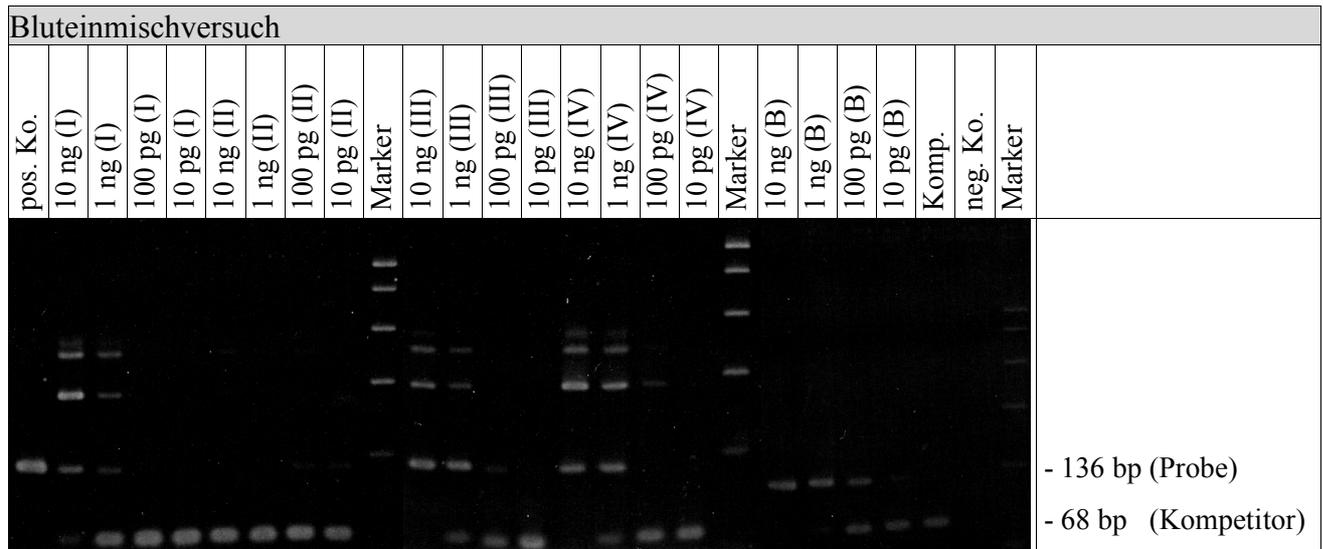


Abbildung 3.8: Patienten

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Die kürzeren 68 bp Produkte sind in der Abbildung weiter unten, die längeren 136 bp Produkte weiter oben dargestellt. Die densitometrische Auswertung (siehe 2.2.10.) der Banden ergab folgendes Ergebnis:

Lane	RNA-Isolat	RNA-Kompetitor	% Anteil (Probe / Kompetitor)	Ratio
1	5 ng (SK-BR-3)	-	74,9 / -	-
2	10 ng (Patient I)	10 fg	14,5 / 8,0	1,81
3	1 ng (Patient I)	10 fg	8,0 / 37,9	0,21
4	100 pg (Patient I)	10 fg	3,2 / 59,7	0,05
5	10 pg (Patient I)	10 fg	- / 72,7	< 0,05
6	10 ng (Patient II)	10 fg	- / *	-
7	1 ng (Patient II)	10 fg	- / *	-
8	100 pg (Patient II)	10 fg	- / *	-
9	10 pg (Patient II)	10 fg	- / *	-
11	10 ng (Patient III)	10 fg	38,8 / -	> 1,99
12	1 ng (Patient III)	10 fg	39,1 / 19,6	1,99
13	100 pg (Patient III)	10 fg	10,8 / 46,2	0,23
14	10 pg (Patient III)	10 fg	- / 75,9	< 0,23
15	10 ng (Patient IV)	10 fg	28,7 / 1,7	16,9
16	1 ng (Patient IV)	10 fg	34,3 / 17,4	1,97
17	100 pg (Patient IV)	10 fg	1,9 / 51,2	0,04
18	10 pg (Patient IV)	10 fg	- / 62,8	< 0,04
20	10 ng (Proband B)	10 fg	45,1 / -	> 10,3
21	1 ng (Proband B)	10 fg	21,7 / 2,1	10,3
22	100 pg (Proband B)	10 fg	16,5 / 20,8	0,79
23	10 pg (Proband B)	10 fg	2,9 / 21,9	0,13
24	-	10 fg	- / 40,2	-

Bei den untersuchten Blutproben der Patientinnen treten die Banden des Kompetitors entgegen den Erwartungen insgesamt stärker hervor als beim gesunden Probanden B, bei dem insgesamt den Ergebnissen aus 3.1.6.1. vergleichbare Quotienten der Flächenintegrale der ErbB2-Bande zu der Standard-Bande ermittelt werden konnten. Eine Untersuchung auf β -Actin zum Nachweis des Vorhandenseins von RNA war bei allen Proben (auch bei Patient II) positiv. Bei Patient II zeigten sich nur sehr schwache erbB2 Banden, bei deutlich dominierenden Banden des Kompetitors, so dass hier auf eine densitometrische Auswertung verzichtet wurde.

Patientin I hatte ein inflammatorisches Mammakarzinom Stadium T4 N1 MX.

Patientin II befand sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme vor einer geplanten Mammaablation im Stadium T4 N2 MX.

Bei Patientin III waren ossäre Metastasen nachgewiesen worden.

Patientin IV kam mit einem Mammakarzinom der linken Brust im Stadium T1c NX MX.

Proband B war ein gesunder männlicher Erwachsener ohne Anzeichen maligner tumoröser Veränderungen.

Im Vergleich zur „negativen Kontrolle“, also dem Probanden B konnte bei keiner der untersuchten 7 Patientinnen eine signifikant höhere ErbB2-Expression festgestellt werden. Ganz im Gegenteil zeigte sich zumeist lediglich bei einer Konzentration von 10 ng Ausgangs-RNA eine deutliche ErbB2-Bande. Bei geringeren Konzentrationen war die ermittelte Ratio stets unterhalb von der „negativen Kontrolle“.

Da nur etwa 1/3 aller Mammakarzinome überhaupt eine Überexpression von ErbB2 zeigen, ist aus diesen Ergebnissen jedoch keine weitere Aussage zu treffen.

3.2. RT-PCR mit der Taqman[®]-Sonde an isolierter RNA

3.2.1. Bestimmung der Reaktionsbedingungen

Für die Durchführung der PCR mit der Taqman[®]-Sonde und dem hierzu mit Hilfe der „Primer Express“-Software ermittelten passenden Primerpaar IS1 und IS2 mussten zunächst die notwendigen Reaktionsbedingungen eingestellt werden. Hierbei wurde die Temperatur für das Annealing sowie die Konzentration von DMSO im Reaktionsansatz bestimmt.

3.2.1.1. Bestimmung der Annealing-Temperatur

Hierfür wurde in einem Robocycler™ Gradient 40 der Firma Stratagene, Heidelberg, zunächst eine PCR mit einem Wärmegradienten von 50 °C bis 64 °C nach folgendem Schema durchgeführt:

Zyklus	Denaturierung 94 °C	Annealing: Gradient 50 °C – 64 °C	Synthese 68 °C
1. Zyklus	4 min	1 min	1 min 10 sek
2. – 41. Zyklus	1 min	1 min	1 min 10 sek
42. Zyklus	1 min	1 min	8 min

Als template dienten in jedem Ansatz 100 pg isolierte SK-BR-3-RNA. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte wie unter 2.2.9. beschrieben in einem Agarosegel aufgetrennt.

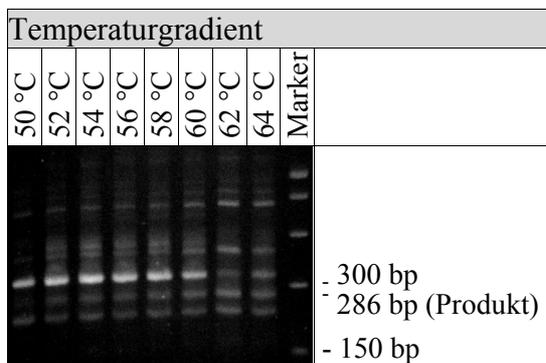


Abbildung 3.9: Temperaturgradient

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Die kürzeren Produkte sind in der Abbildung weiter unten, die längeren weiter oben dargestellt. Bei einer Annealing-Temperatur von 62 °C und 64 °C zeigen sich im Vergleich zu den niedrigeren Temperaturen deutliche Banden unterhalb der 300er-Bande des Längenstandards, die dem 286 bp langen gesuchten Produkt entsprechen. Zudem sind die weiterhin vorhandenen Banden vergleichsweise geringer ausgeprägt.

Da offensichtlich erst bei höheren Annealing-Temperaturen die gesuchte Zielsequenz in ausreichendem Maße amplifiziert wird und somit Annealing- und Synthese-Temperatur nur noch wenig auseinander liegen, wurde im weiteren Verlauf eine 2-Schritt-PCR-Methode mit kombinierter Annealing- und Synthese-Phase gewählt.

3.2.1.2. Bestimmung der DMSO-Konzentration

Hierfür wurde wie unter 2.2.11.3. beschrieben eine 2-Schritt-PCR nach folgendem Schema durchgeführt:

Zyklus	56 °C	Denaturierung: 94 °C	kombinierte Annealing- und Synthesephase: 64 °C
Umschrift	30 min		
1. Zyklus		4 min	1 min 30 sek
2. – 41. Zyklus		1 min	1 min 10 sek
42. Zyklus		1 min	8 min

Als template dienten in jedem Ansatz 100 pg isolierte SK-BR-3-RNA. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte wie unter 2.2.9. beschrieben in einem Agaroseggel aufgetrennt.

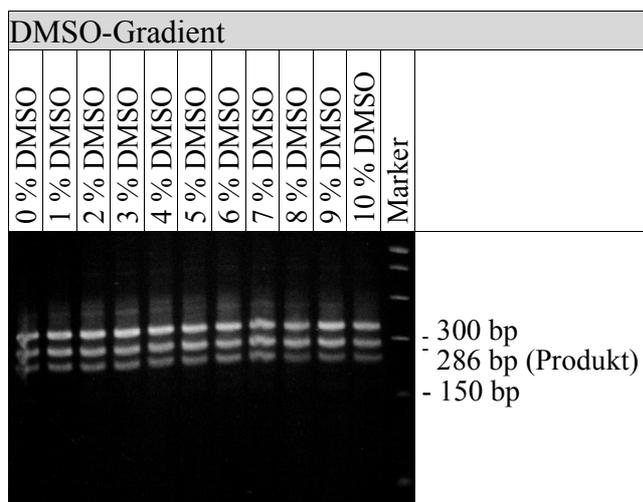


Abbildung 3.10: DMSO-Gradient

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Die DMSO-Konzentration hatte in den gewählten Konzentrationsbereichen augenscheinlich keinen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis der PCR. Im weiteren wurde daher auf den Einsatz von DMSO im Versuchsansatz verzichtet.

3.2.1.3. Bestimmung der Annealing- und Synthese-Temperatur

Hierfür wurde wie unter 2.2.11.3. beschrieben eine 2-Schritt-PCR nach folgendem Schema durchgeführt

Zyklus	56 °C	Denaturierung: 94 °C	kombinierte Annealing- und Synthesephase Gradient 56 °C – 70 °C
Umschrift	30 min		
1. Zyklus		4 min	1 min 30 sek
2. – 41. Zyklus		1 min	1 min 10 sek
42. Zyklus		1 min	8 min

Als template dienten in jedem Ansatz 100 pg isolierte SK-BR-3-RNA. Zum Vergleich im Fluorimeter wurde der Versuchsansatz einmal mit und einmal ohne Zusatz von Enzym-Mix durchgeführt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte aus dem Ansatz mit Enzym-Mix Zugabe wie unter 2.2.9. beschrieben in einem Agarosegel aufgetrennt.

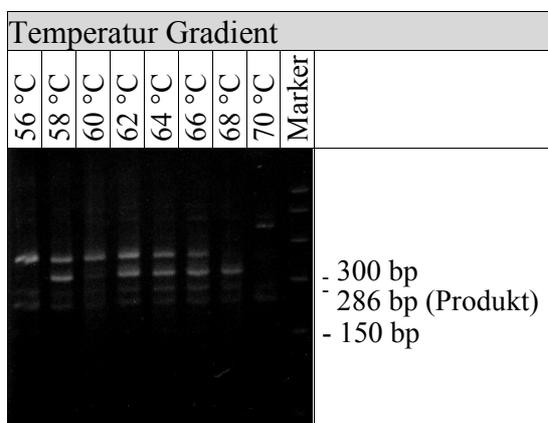


Abbildung 3.11: Temperaturgradient

Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels.

Bezüglich der gesuchten Bande bei 286 bp ergab sich kein entscheidender Unterschied bei den unterschiedlichen Temperaturen. Insgesamt war die Bande bei 64 °C jedoch am kräftigsten ausgeprägt, so dass diese Temperatur für die weiteren Versuche als kombinierte Annealing- und Synthese-Temperatur eingesetzt wurde.

Beide Ansätze, also mit und ohne Zusatz von Enzym-Mix, wurden zudem im Fluorimeter wie unter 2.2.11.4. beschrieben gemessen.

	56 °C	58 °C	60 °C	62 °C	64 °C	66 °C	68 °C	70 °C
512 nm mit Enzym-Mix	2210	1900	2147	2230	2085	2052	2003	1420
582 nm mit Enzym-Mix	586,5	544,9	484,2	574,4	565,0	538,6	550,7	570,3
R/Q-Ratio	3,77	3,49	4,43	3,88	3,69	3,81	3,64	2,49
512 nm ohne Enzym-Mix	825,6	766,7	757,5	818,1	795,8	802,8	846,8	648,8
582 nm ohne Enzym-Mix	656,1	599,6	593,1	646,4	633,2	631,0	653,4	483,6
R/Q-Ratio	1,26	1,28	1,28	1,27	1,26	1,27	1,30	1,34

Ohne Zusatz von Enzym-Mix bleiben erwartungsgemäß die PCR-Reaktionen aus. Alle Ansätze zeigen in etwa die gleiche Fluoreszenzintensität. Im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel sind erwartungsgemäß auch keine Banden nachweisbar gewesen.

Mit Zusatz von Enzym-Mix findet sich durchweg ein deutliches Fluoreszenzsignal. Die höchste Ratio, also der höchste Quotient aus der Fluoreszenz von Reporter und Quencher, findet sich bei einer Temperatur von 60 °C. Um die Spezifität zu erhöhen wurde jedoch für die weiteren Untersuchungen eine Temperatur von 64 °C gewählt.

3.2.2. Verdünnungsreihe

Mit der unter 2.2.11.3. beschriebenen Methode wurde nach Einstellung der Reaktionsbedingungen schließlich eine Verdünnungsreihe durchgeführt.

Hierzu wurde isolierte SK-BR-3-RNA in unterschiedlicher Konzentration nach folgendem Schema eingesetzt:

Cup	RNA-Isolat aus SK-BR-3-Zellen	Zusatz	Anmerkung
1	100 pg	ohne primer	Primer-Kontrolle
2	100 pg	ohne Sonde	Sonden-Kontrolle
3	100 pg	TAQ-Polymerase statt Enzym-Mix	TAQ-Kontrolle
4	100 pg	ohne Enzym-Mix	Enzym-Kontrolle
5	ohne SK-BR-3-RNA	komplett	Negativ-Kontrolle
6	10 ng	komplett	
7	1 ng	komplett	
8	100 pg	komplett	
9	10 pg	komplett	
10	1000 fg	komplett	
11	100 fg	komplett	

Es wurden die Fluoreszenzintensitäten im Fluorimeter wie unter 2.1.11.4. beschrieben ermittelt und die Ratio aus den Fluoreszenzintensitäten von Reporter und Quencher errechnet.

	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
Primer-Kontrolle	1188	598,1	1,99
Sonden-Kontrolle	17,43	27,2	0,64
TAQ-Kontrolle	998,4	665,0	1,50
Enzym-Mix-Kontrolle	916,5	644,7	1,42
Negativ-Kontrolle	1322	685,9	1,93
SK-BR-3-RNA (10 ng)	2730	545,1	5,01
SK-BR-3-RNA (1 ng)	2451	565,0	4,34
SK-BR-3-RNA (100 pg)	1784	584,5	3,05
SK-BR-3-RNA (10 pg) (\approx 1 Zelle)	1260	533,3	2,36
SK-BR-3-RNA (1000 fg)	1271	597,7	2,13
SK-BR-3-RNA (100 fg)	1298	648,7	2,00

Die R/Q-Ratio der Untersuchten RNA-Proben von SK-BR-3-Zellen steigt proportional zur eingesetzten Ausgangsmenge von RNA, deutliche Abweichungen ($> 50\%$ höheres Fluoreszenzsignal im Vergleich zu Primer- und Negativ-Kontrolle) zeigen sich ab einer Menge von 100 pg eingesetzter Ausgangsmenge von SK-BR-3-RNA.

Die Grund- oder Eigenfluoreszenz des Systems liegt bei einem R/Q-Quotienten von 2,00. Wesentlich niedrigere Werte werden lediglich in der Sonden-Kontrolle, also ohne Anwesenheit von Sonde erzielt, da die Sonde ja Träger der Fluoreszenzfarbstoffe ist.

Bei erwartungsgemäßem Ausfall der Kontrollen ist das System in der Lage, einen erhöhten ErbB2-Level in 100 pg (\approx 10 Zellen) isolierter RNA von SK-BR-3-Zellen zu detektieren.

3.2.3. Bluteinmischversuch

Analog zum unter 3.1.6.2. beschriebenen Bluteinmischversuch wurden die hier hergestellten RNA-Isolate auch mittels des unter 2.2.11.3. beschriebenen Taqman®-Sonden-Systems untersucht. Die folgende Tabelle gibt die verwendeten RNA-Isolate bzw. die Kontrollen wieder:

Cup	RNA-Isolat	Zusatz	Anmerkung
1	10 ng SK-BR-3-RNA	ohne primer	Primer-Kontrolle
2	-	keine RNA	Negativ-Kontrolle
3	10 ng (Proband A)	komplett	
4	10 ng (Proband A + 10 SK-BR-3-Zellen)	komplett	
5	10 ng (Proband A + 100 SK-BR-3-Zellen)	komplett	
6	10 ng (Proband A + 1.000 SK-BR-3-Zellen)	komplett	
7	10 ng (Proband A + 10.000 SK-BR-3-Zellen)	komplett	
8	10 ng SK-BR-3-RNA	komplett	Positiv-Kontrolle

Die folgende Tabelle gibt die im Fluorimeter wie unter 2.1.11.4. beschrieben ermittelten Fluoreszenzen sowie die daraus errechnete R/Q-Ratio wieder.

	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
Primer-Kontrolle	1363	638,2	2,14
Negativ-Kontrolle	1347	620,3	2,17
10 ng (Proband A)	1674	566,9	2,95
10 ng (Proband A + 10 SK-BR-3-Zellen)	1864	650,9	2,86
10 ng (Proband A + 100 SK-BR-3-Zellen)	1674	582,3	2,87
10 ng (Proband A + 1.000 SK-BR-3-Zellen)	2152	550,6	3,91
10 ng (Proband A + 10.000 SK-BR-3-Zellen)	3597	578,6	6,22
Positiv-Kontrolle	3602	514,0	7,01

Es findet sich eine Grundfluoreszenz mit einer R/Q-Ratio unter 2,2. Bereits bei einer Zellzahl von 1.000 SK-BR-3-Zellen auf 5 ml EDTA-Blut ist ein signifikanter Unterschied feststellbar. Im Vergleich zum unter 3.1.6.2. beschriebenen Bluteinmischversuch ergab sich ein eindeutiges Ergebnis hier bereits eine 10er Potenz früher. Eine signifikante Erhöhung der ErbB2-Expression ist mit dieser Methode also rechnerisch durch eine SK-BR-3-Zelle unter 25.000 weißen Blutkörperchen nachweisbar. Somit ist das hier verwendete System im direkten Vergleich sowohl in der Anwendbarkeit deutlich vereinfacht und zeitlich weniger arbeitsintensiv, als auch im Resultat empfindlicher.

3.2.4. Reproduzierbarkeit und Analogie

Beim Vergleich der kompetitiven RT-PCR mit der RT-PCR mittels Taqman[®]-Sonde zeigen sich vergleichbare Ergebnisse. Analog zu der Abnahme des prozentualen Verhältnisses zwischen eingesetzter RNA-Probe und Kompetitor nimmt hier mit geringerer Konzentration von eingesetzter RNA die Intensität des ausgegebenen Fluoreszenzsignals ab. Eine zumindest semiquantitative Aussage ist trotz des fehlenden Kompetitors dennoch möglich, wenn die erreichten Fluoreszenzsignale in Bezug zu einer Standard-Verdünnungsreihe mit bekannter ErbB2-Konzentration gesetzt werden.

3.3. IS-RT-PCR mit der Taqman[®]-Sonde an hierzu präparierten Zellen

Ein weiterer Schritt in Richtung auf eine einfache, schnelle und kostengünstige Screeningmethode ist mit dem direkten Einsatz der zu untersuchenden Zellen gegeben, da hier keine Isolierung von RNA mehr notwendig ist. Hierbei wurde zunächst versucht, im Anschluss an die PCR die RNA direkt in der Zelle mittels Laserscan-Mikroskopie zu erfassen. Im Laufe der hierzu durchgeführten Versuchsreihen zeigte sich jedoch, dass die Zellen selbst nur ein sehr unspezifisches Fluoreszenzbild liefern. Im zellfreien Überstand hingegen finden sich bei entsprechender Vorbehandlung der Zellen jedoch deutliche Fluoreszenzsignale, die den Ergebnissen aus den Versuchen mit isolierter RNA sehr nahe kommen.

3.3.1. Optimierung der Fixierung und Permeabilisierung

Um dem speziell bei der in situ PCR vorhandenen Problem der Diffusionsartefakte entgegen zu wirken sind folgende Maßnahmen notwendig:

- geeignete Fixation und Permeabilisation
- Reduktion der PCR-Zyklenzahl
- Generierung möglichst langer PCR-Produkte um eine Diffusion aus der Zelle heraus zu vermeiden

Mit Erstellung der Primer-Sonden Kombination sowie durch die Optimierung der Methode unter Einsatz von isolierter RNA konnte den beiden letztgenannten Punkten bereits Rechnung getragen werden.

Es galt nun, ein geeignetes Medium zu finden, welches die Zellen in ausreichendem Maße für die in der PCR verwendeten Reagenzien durchgängig, gleichzeitig aber auch für das gebildete Produkt möglichst undurchlässig macht und für eine spätere Übertragung auf einen Objektträger insgesamt ausreichend fixiert und stabilisiert.

Hierzu wurden Versuche mit einer Kombination aus Formalin und Triton X100 sowie den kommerziellen Produkten IntraPrep[™] und PermeaFix[™] durchgeführt.

Für die Durchführung der Versuche wurden mittels Zählkammermethode definierte Mengen von SK-BR3-Zellen (ca. 500.000 Zellen in 50 µl PBS) jeweils der entsprechenden Fixierungs- und Permeabilisierungsmethode unterzogen.

3.3.1.1. Fixierung und Permeabilisierung: IntraPrep™

Neben den Ansätzen mit vollem Reagenzienzusatz wurden die folgenden Kontrollen durchgeführt. Ein Ansatz ohne Primer, ein Ansatz ohne Sonde, einer ohne Enzym-Mix und einer mit Zusatz von TAQ-Polymerase statt dem normalerweise verwendeten Enzym-Mix.

Im Anschluss an die in situ-RT-PCR wurden die Zellen und der Überstand zunächst zusammen im Fluorimeter untersucht. Danach wurden mit Hilfe einer Ultrazentrifuge bei 2000 U/min Zellen und Überstand voneinander getrennt und erneut getrennt voneinander im Fluorimeter untersucht.

Die folgenden Tabellen geben die im Fluorimeter, wie unter 2.1.11.4. beschrieben, ermittelten Fluoreszenzen sowie die daraus errechnete R/Q-Ratio in den Fraktionen Zellen, Überstand und Zellen plus Überstand wieder.

Zellen plus Überstand	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
Primer-Kontrolle	1194	576,9	2,07
Sonden-Kontrolle	27,5	23,1	1,19
TAQ-Kontrolle	2633	529,1	4,98
Enzym-Mix-Kontrolle	1049	592,0	1,77
Negativ Kontrolle (keine Zellen)	1218	597,2	2,04
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	2525	475,6	5,31
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	2950	546,4	5,40

Zellen	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
Primer-Kontrolle	36,8	39,4	0,93
Sonden-Kontrolle	10,5	20,8	0,50
TAQ-Kontrolle	59,8	34,9	1,71
Enzym-Mix-Kontrolle	14,4	22,9	0,63
Negativ-Kontrolle (keine Zellen)	- *	- *	- *
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	54,18	52,45	1,03
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	50,43	39,42	1,28

* Die Negativ-Fraktion enthielt keine Zellen, somit war eine Messung nicht möglich.

Überstand	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
Primer-Kontrolle	1075	500,9	2,15
Sonden-Kontrolle	26,4	27,2	0,97
TAQ-Kontrolle	1982	404,9	4,90
Enzym-Mix-Kontrolle	830,7	439,3	1,89
Negativ-Kontrolle (keine Zellen)	1097	524,4	2,09
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	2109	398,5	5,29
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	2215	402,8	5,50

Das eigentliche Fluoreszenzsignal geht offensichtlich vom Überstand aus. Vergleicht man die Ergebnisse der Messung des Überstands mit der von Zellen plus Überstand, so finden sich sehr vergleichbare Resultate. IntraPrep™ ist bei einer der Arbeitsvorschrift folgenden Anwendung offensichtlich nicht geeignet, die Zellen derart zu stabilisieren, dass die gebildeten DNA-Produkte und/oder die voneinander getrennten Fluorophore (Quencher und Reporter) zumindest überwiegend im Zellinnern verbleiben. Die hohe R/Q-Ratio in der TAQ-Kontrolle spricht zudem dafür, dass neben der Permeabilisierung der Zellwand auch der Zellkern durchlässig geworden sein muss, da hier direkt DNA, nicht aber mittels reverser Transkriptase in DNA umgeschriebene RNA nachgewiesen wurde.

Da für die ursprünglich geplante in situ-RT-PCR offensichtlich die Zellen durch das verwendete System zu durchlässig gemacht wurden, wurde in einem weiteren Versuchsansatz die Permeabilisierungszeit variiert. Nach 20minütiger Fixation in IntraPrep™-Reagent 1 und Waschen in PBS folgte eine Permeabilisierung mit IntraPrep™-Reagent 2 für 1, 3, 6, 9 bzw. 15 Minuten.

Die folgende Tabelle gibt die ermittelten Fluoreszenzsignale in der Zellfraktion und im Überstand wieder:

	Zellen			Überstand		
	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
1 Minute permeabilisiert	326,0	172,6	1,88	3056	539,4	5,66
3 Minuten permeabilisiert	405,5	204,8	1,97	3056	574,4	5,32
6 Minuten permeabilisiert	354,4	205,0	1,72	3264	586,9	5,56
9 Minuten permeabilisiert	269,1	164,1	1,62	3102	533,3	5,81
15 Minuten permeabilisiert	392,6	209,7	1,87	2277	470,8	4,83

Die R/Q-Ratio ist im Überstand im Vergleich zu den Zellen etwa um das 3fache erhöht. Die für die Zellen ermittelte R/Q-Ratio liegt jeweils etwa im Bereich der „Grundfluoreszenz“ durch das Taqman®-System. Offensichtlich ist auch durch Variation der Permeabilisierungszeit bis zu einer Minute kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Im Überstand sind weiterhin die eigentlichen Fluoreszenzsignale zu erfassen.

3.3.1.2. Fixierung: Formalin 3,7%ig

Um zu überprüfen, ob in der alleinigen Fixation eine geeignete Vorbehandlung der Zellen liegen könnte, wurde eine per Zählkammermethode definierte Menge von SK-BR-3-Zellen (500.000 Zellen) über Nacht (16 Stunden) mit 3,7%iger Formalinlösung fixiert. Anschließend erfolgte, wie unter 2.2.11.3. beschrieben, die Durchführung einer is-RT-PCR.

Die folgende Tabelle gibt die ermittelten Fluoreszenzsignale sowie die R/Q-Ratio wieder:

	Zellen			Überstand		
	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
Enzym-Mix-Kontrolle	40,7	30,2	1,35	1397	479,7	2,91
TAQ-Kontrolle	17,4	23,6	0,74	1505	490,0	3,07
Positiv-Kontrolle (SK-BR-3)	10,3	17,2	0,60	1461	476,4	3,07

Die Fluoreszenzsignale in den Zellen sind weiterhin zu vernachlässigen. Im Überstand finden sich unter Verwendung von TAQ-Polymerase statt Enzym-Mix sowie ohne Enzym-Mix nahezu die gleichen Fluoreszenz Signale wie unter Verwendung des Enzym-Mix. Signifikante Ergebnisse sind mit dieser Fixierungsmethode weder in der Zellfraktion noch im Überstand zu erzielen.

3.3.1.3. Fixierung und Permeabilisierung: PermeaFix™

Da die unter 3.3.1.1. und 3.3.1.2. beschriebenen Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden offensichtlich für die Durchführung einer in situ RT-PCR ungeeignet waren, wurde ein weiteres kommerzielles System, Ortho-PermeaFix™, zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen untersucht.

Hierzu wurde eine SK-BR-3 Zellsuspension in PBS hergestellt. Mittels Zählkammermethode wurden 3 Fraktionen mit jeweils 500.000 Zellen hergestellt. Es erfolgte dann eine Behandlung mit Ortho-PermeaFix™ für 1 Stunde bzw. 24 Stunden. Die dritte Fraktion blieb unbehandelt.

Nach der Inkubation wurden die Zellen in PBS gewaschen und nach der unter 2.2.11. ff beschriebenen Methode eine in situ-RT-PCR durchgeführt.

Die folgenden Tabellen geben die Fluoreszenzsignale in den einzelnen Fraktionen wieder (gemessen wurde die Fluoreszenz des Überstandes):

unfixiert	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
Primer-Kontrolle	890,8	228,9	3,89
Sonden-Kontrolle	21,0	15,8	1,32
TAQ-Kontrolle	1383	315,5	4,38
Enzym-Mix-Kontrolle	717,2	334,7	2,14
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	980,7	316,7	3,09
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	1045	333,4	3,13

Bei unfixierten Zellen ist eine vergleichsweise hohe R/Q-Ratio in der Primer-Kontrolle und der TAQ-Kontrolle auffällig. Die Ergebnisse der Fraktion mit allen Reagenzien (Positiv-Kontrolle) zeigen vergleichsweise niedrige Werte.

Offensichtlich ist ohne eine ausreichenden Fixierung und Permeabilisierung kein adäquates Ergebnis zu erzielen.

60 Minuten PermeaFix™	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
Primer-Kontrolle	475,3	247,0	1,92
Sonden-Kontrolle	15,5	14,0	1,10
TAQ-Kontrolle	1148	310,9	3,69
Enzym-Mix-Kontrolle	538,1	336,7	1,59
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	1388	296,1	4,68
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	1243	242,2	5,13

Die Ergebnisse entsprechen in ihrer Tendenz denen, wie sie auch unter Verwendung von IntraPrep™ erzielt wurden. Auffällig ist erneut eine sehr hohe R/Q-Ratio in der TAQ-Kontrolle. Es scheint also erneut DNA als Matrize gedient zu haben.

24 Stunden PermeaFix™	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
Primer-Kontrolle	330,3	193,3	1,70
Sonden-Kontrolle	16,0	13,9	1,15
TAQ-Kontrolle	675,8	269,0	2,51
Enzym-Mix-Kontrolle	437,1	293,9	1,48
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	544,9	268,6	2,02
SK-BR-3-Zellen (Positiv-Kontrolle)	614,5	302,1	2,03

Nach 24stündiger Fixation sind die im Überstand gemessenen Fluoreszenzsignale nicht signifikant unterschiedlich. Die vergleichsweise höchste Fluoreszenzintensität erzielt hier immer noch die TAQ-Kontrolle.

Bezüglich der Untersuchung des Überstandes ist kein entscheidender Unterschied zwischen der Verwendung von IntraPrep™ und PermeaFix™ festzustellen. Die Durchführung mittels PermeaFix™ ist jedoch aufgrund der kombinierten Fixierung und Permeabilisierung deutlich einfacher.

3.3.2. Laserscanmikroskopie

Zur Untersuchung des Fluoreszenzsignals innerhalb der unter 3.3.1.3. verwendeten Zellen wurde von den 60 Minuten fixierten und permeabilisierten SK-BR-3-Zellen eine konfokale Laserscanmikroskopie durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen nach Umschrift und PCR mittels einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger übertragen und anschließend in einem Laserscanmikroskop der Firma Leica untersucht.

Mittels der Software Scion Image rel. 2ß der Firma Scion Corporation wurde von den im Laserscanmikroskop im TIF Format angefertigten Bildern die mittlere Pixelintensität sowie die integrierte Dichte ermittelt. Zur Ermittlung der integrierten Dichte bei dem in 256 Graustufen vorliegenden Bild werden die Graustufenwerte (0 für Schwarz und 255 für Weiß) aller im Bild dargestellten Pixel addiert. Die mittlere Dichte ermittelt sich durch Division des ermittelten Werts durch die Gesamtzahl der dargestellten Pixel.

Unter gleichen Bedingungen zeigten hierbei die Positiv-Kontrollen, also die alle Reagenzien zur Umschrift und PCR enthaltenden Ansätze aus 3.3.1.3., das mit Abstand höchste Fluoreszenzsignal.

Sonden-Kontrolle, TAQ-Kontrolle und Enzym-Mix-Kontrolle zeigten im Vergleich hierzu nur schwache Fluoreszenzintensitäten.

In der Primer-Kontrolle waren jedoch ebenfalls sehr hohe Fluoreszenzsignale vorhanden.

Bei der Berechnung der R/Q-Ratio war keine eindeutige Aussage zu treffen. Zwar zeigte die Positiv-Fraktion die insgesamt höchste Ratio, eine signifikante Abgrenzung zu den Kontrollen war jedoch nicht möglich, da das Ergebnis stark von den ausgewählten Zellen bzw. dem ausgewählten Bildausschnitt abhängig war.

Insgesamt konnte durch die Untersuchungen am Laserscanmikroskop tendenziell bestätigt werden, dass eine Amplifikation von genetischem Material in den Zellen stattgefunden haben muss. Die Tatsache, dass auch im Zellplasma deutliche Fluoreszenzsignale vorhanden sind, spricht dafür, dass hier RNA nachgewiesen wurde. Gleichzeitig ist jedoch auch ein deutliches Fluoreszenzsignal im Zellkern erkennbar, was nicht durch überlagertes Zellplasma allein

erklärt werden kann. Inwieweit intranukleäre RNA oder DNA hier als Matrize gedient hat, ist nicht mit Sicherheit zu sagen. Der Nachweis von intrazellulärer Fluoreszenz könnte jedoch für eine erhöhte Transskription von ErbB2 sprechen. Allerdings kann es sich auch um Diffusionsartefakte aus dem Zellkern heraus, also letztlich um ein „verschobenes“, auf DNA beruhendes Fluoreszenzsignal handeln.

Die folgende Tabelle gibt die ermittelten mittleren Dichten sowie die integrierten Dichten der einzelnen PCR-Fractionen wieder.

	mittlere Dichte			integrierte Dichte		
	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio	518 nm	582 nm	R/Q-Ratio
Enzym-Mix-Kontrolle	1,53	2,72	0,56	138644	451905	0,3
TAQ-Kontrolle	0,00	0,56	0	102	145830	0
Sonden-Kontrolle	0,00	0,06	0	70	15487	0
Primer-Kontrolle	5,6	11,7	0,47	1206660	2805483	0,43
Positiv-Fraktion (SK-BR-3)	13,6	12,2	1,11	3303848	2925588	1,12
Positiv-Fraktion (SK-BR-3)	8,12	6,72	1,2	1867403	1500140	1,24
Positiv Fraktion (SK-BR-3)	1,53	2,00	0,76	138941	261551	0,53
Neg.-Fraktion (Leukozyten)	6,95	0,49	14,18	1560844	127874	12,20

Die folgenden Bilder zeigen im Laserscanmikroskop gemachte Aufnahmen. Die Graustufen Bilder sind zur besseren Übersicht grün bzw. rot eingefärbt.

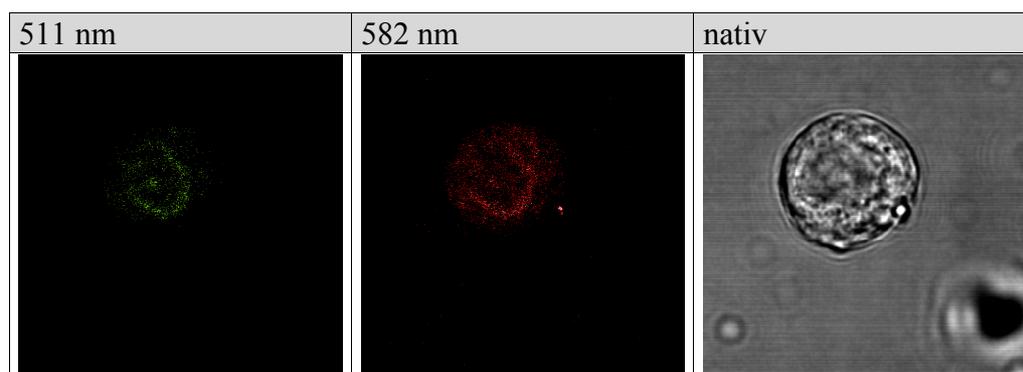


Abbildung 3.12: Enzym-Mix-Kontrolle

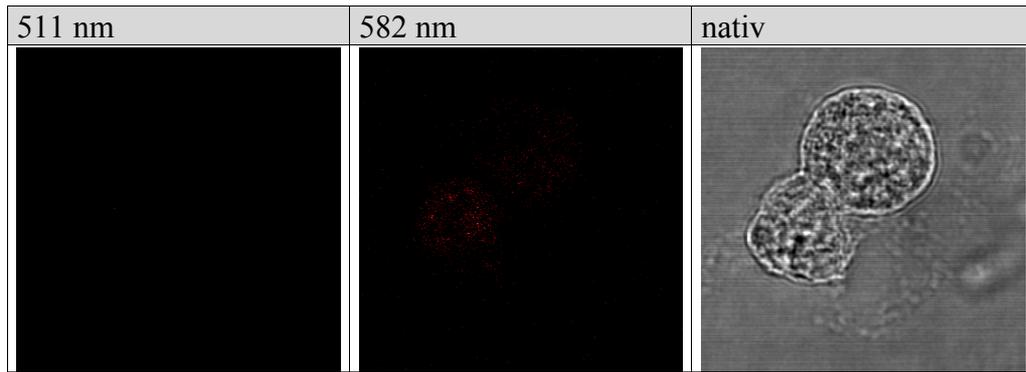


Abbildung 3.13: TAQ-Kontrolle

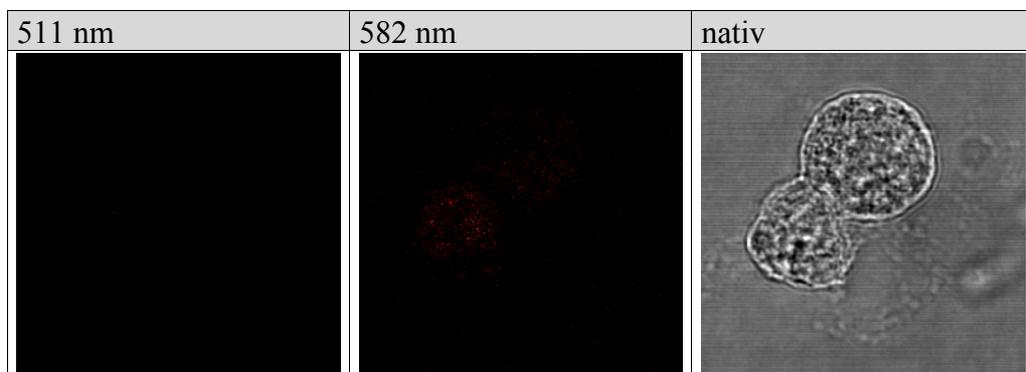


Abbildung 3.14: Sonden-Kontrolle

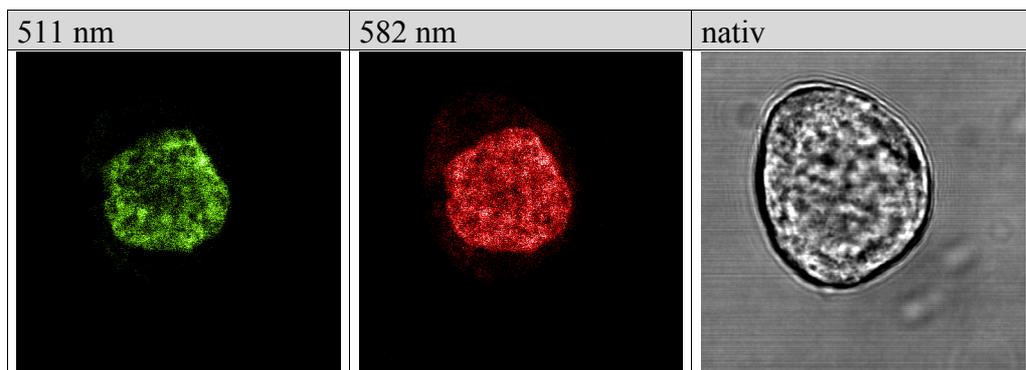


Abbildung 3.15: Primer-Kontrolle

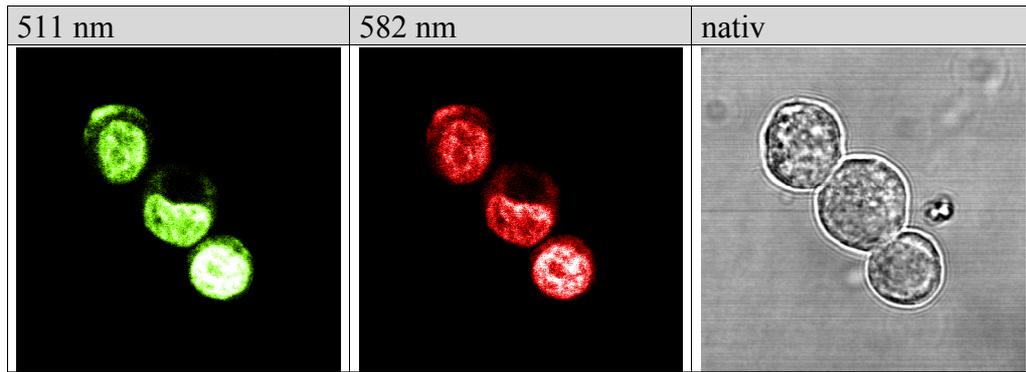


Abbildung 3.16: Positiv-Kontrolle

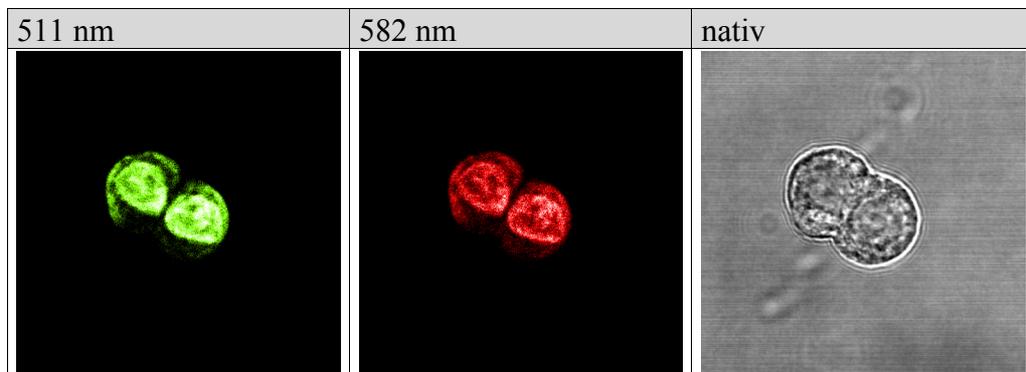


Abbildung 3.17: Positiv-Kontrolle

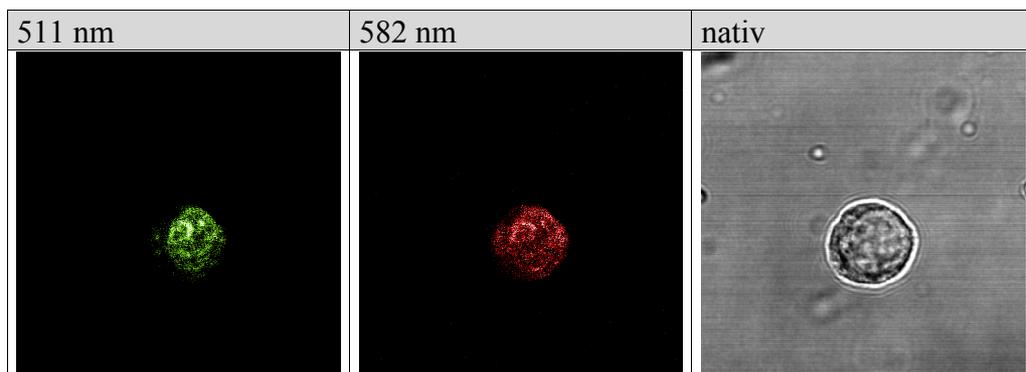


Abbildung 3.18: Positiv-Kontrolle

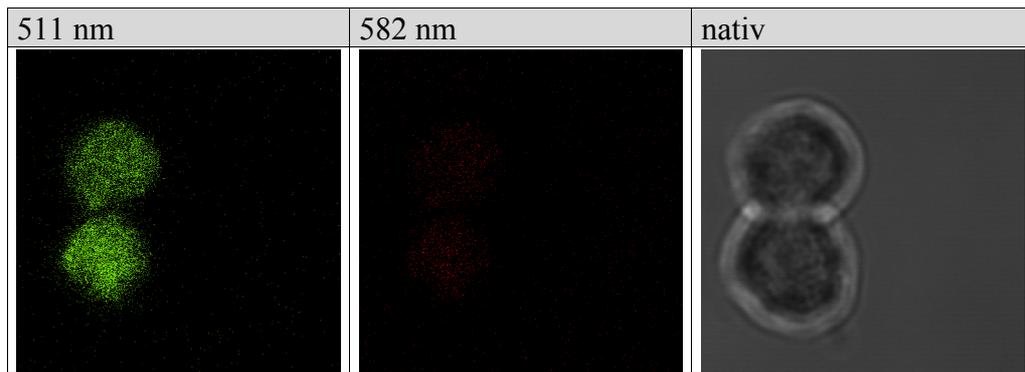


Abbildung 3.19: Negativ-Kontrolle (Leukozyten)

4. Diskussion

4.1. Auswahl der Methodik

In RT-PCR-Untersuchungen konnten bei der Untersuchung von Lymphknotengewebe bis zu eine auffällige Zelle unter 10^6 normalen Zellen detektiert werden. Dennoch ist die traditionelle RT-PCR generell kritisch zu betrachten, da der größte Teil der zur Verfügung stehenden Tumormarker auch in gesundem Gewebe eine Expression zeigt (26). Die Differenzierung zwischen einer "Grundlevel"-Genexpression in gesundem Gewebe und einer erhöhten Expression in Tumorzellen ist daher mittels klassischer Endpunktmessung nur semi-quantitativ möglich.

Ein spezifischer Tumormarker, der in gesundem Gewebe nicht nachweisbar ist, kann problemlos mittels klassischer PCR-Methoden detektiert werden. Bei vorhandener Expression auch in gesundem Gewebe besteht das Problem der Entscheidungsgrenze zwischen positiv und negativ. Lösbar wird dieses Problem durch die Verwendung einer real-time PCR-Methodik.

Da sich die in situ-RT-PCR jedoch nur schwer in Form einer real-time PCR durchführen läßt, bleibt sie diesbezüglich deutlich fehlerbehaftet. Wie in den Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist mit Hilfe der hier zur in situ-RT-PCR verwendeten Reaktionsbedingungen keine eindeutige Differenzierung zwischen stark exprimierenden Zellen und normalen Zellen möglich. Zwar zeigen die Tumorzellen im Vergleich zu den Lymphozyten eine deutlich intensivere Fluoreszenz, die R/Q-Ratio, also das eigentliche Substrat einer abgelaufenen RT-PCR ist jedoch nicht signifikant erhöht.

Für den Einsatz in der Routine ist eine derart aufwendige und zeitintensive Untersuchungsmethodik wenig sinnvoll und nicht durchführbar.

Entscheidend ist es, in den gesammelten Probenmaterialien, zumeist Blutproben oder Lymphknoten, eine Überexpression nachzuweisen. Hierzu bedarf es nicht zwingend einer in situ-RT-PCR.

Die unter 3.2. ff beschriebene Methodik ist hierzu verwendbar, wenn auch weiterhin das Problem der Entscheidungsgrenze zwischen positiv und negativ, dem sogenannten "cut-off-level", besteht. Nur durch den Vergleich mit einer Standardreihe, also dem Vergleich mit den Quotienten der Verhältnisse von Reporter zu Quencher (R/Q-Ratio) von definierten Ausgangsmengen von ErbB2 exprimierenden Tumorzellen ist hier eine näherungsweise Abschätzung der ermittelten Ergebnisse möglich. Da hier kein Patientenmaterial untersucht wurde, bleibt weiterhin unklar, ob sich hier überhaupt vergleichbare Ergebnisse erzielen

lassen. Eine Standardisierung anhand einer an einer Tumorzelllinie ermittelten Standardreihe ist aufgrund gänzlich unterschiedlicher Ausgangsbedingungen zu isolierten Blutzellen zumindest fragwürdig. Weiterhin ist auch die Möglichkeit einer Abnahme der ErbB2-Expression in alten Zellkulturlinien zu bedenken, wodurch eine Standardisierung weiter erschwert wird.

Eine Möglichkeit, die genannten Probleme zu umgehen, bietet der Einsatz einer real-time RT-PCR. Bei dieser Methode ist eine Detektion in der logarithmischen Phase der PCR-Amplifikation möglich, wodurch die Festlegung eines "cut-off-levels" wesentlich erleichtert wird. Durch Vergleich mit einem größeren Kollektiv an gesunden Probanden könnten hier verwertbare Ergebnisse erzielt werden.

4.2. Probleme der RT-PCR

Generell hat die RT-PCR mit einer Reihe von Problemen zu kämpfen, die ihren Einsatz in der Routine auch heute noch teilweise schwierig gestaltet.

Innerhalb einer intakten Zelle findet im Zytosol ein rascher Abbau der gebildeten mRNA und somit eine Begrenzung des translatierten Proteins statt. Die Halbwertszeit der mRNA ist vermutlich unter anderem abhängig von der Länge der am 3'-Ende der mRNA lokalisierten Polyadenylierung (28). Im Vergleich zu den Prokaryonten, bei denen die Halbwertszeit der mRNA bei etwa bei 20 Minuten liegt, ist der mRNA-Abbau bei Eukaryonten deutlich komplexer gestaltet. Auch hier ist jedoch nicht mit einer deutlich längeren Halbwertszeit zu rechnen, so dass beim Nachweis von mRNA eine rasche Probenverarbeitung von großer Bedeutung ist.

Eine Verunreinigung mit RNAsen im Laufe der Probenverarbeitung ist ein weiterer, die Validität entscheidend beeinflussender Faktor.

Als Matrize dient in der detektierenden PCR die zuvor aus mRNA mittels reverser Transkription hergestellte cDNA. Die in dieser Arbeit nach der unter 3.2. ff beschriebenen RT-PCR mit der Taqman[®]-Sonde eingesetzten Basensequenzen des Primers IS-1 und der Sonde finden sich im humanen *c-erbB2*-Gen auf dem 190 Basen langen Exon 2 wieder. Der Primer IS-2 findet sich durch ein 135 Basen langes Intron getrennt auf dem Exon 3. Auf DNA-Ebene schließt das Primerpaar also einen 373 Basen langen Bereich ein. Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen ist also durchaus auch die DNA als mögliche Ausgangssequenz in Betracht zu ziehen. Da bei der RT-PCR mit der Taqman[®]-Sonde nicht das Produkt selbst, sondern der veränderte Quotient aus Fluoreszenzintensität von Reporter

und Quencher ermittelt wird, ist eine eindeutige Differenzierung, ob als Ausgangssequenz DNA oder RNA gedient hat, nicht möglich. Bei der unter 3.2. ff beschriebenen Methode wird als Ausgangsmaterial isolierte RNA eingesetzt. Somit ist bei dieser Methode ein eindeutiger Nachweis von RNA gewährleistet.

4.3. Probleme der *in situ* PCR

Wesentliche Probleme der *in situ* PCR stellen so genannte Diffusionsartefakte, DNA-Reparaturartefakte sowie das endogene Priming bei der *in situ*-RT-PCR dar.

Vor allem bei der Durchführung der *in situ*-PCR in Suspension können PCR-Produkte aus der Zelle heraus diffundieren und so als templates für eine extrazelluläre Amplifikation dienen. Diese amplifizierte DNA-Sequenzen können in template-negative Zellen hinein diffundieren oder sich an deren Oberfläche heften und so falsch-positive Ergebnisse hervorrufen. Dieser Effekt wird größer, wenn kurze DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Eine signifikante Reduktion der Diffusionsartefakte kann durch geeignete Fixation und Permeabilisation, Reduktion der PCR-Zykluszahl auf weniger als 30 Zyklen sowie durch Generierung längerer PCR-Produkte mit Hilfe von entsprechenden Primer Paaren erreicht werden (24).

Bei der von mir unter 3.3. ff beschriebenen Methode wurden Zellen direkt für die Durchführung der RT-PCR verwendet. Da sich bei den ErbB2-exprimierenden SK-BR-3-Zellen im Überstand ein deutliches Fluoreszenzsignal messen ließ, ist die Methode als reine *in situ*-RT-PCR mit den verwendeten Reagenzien zur Fixierung und Permeabilisierung nicht geeignet. Diffusionsartefakte sind insofern von großer Bedeutung, als die durch die Trennung von Quencher und Reporter entstandenen sehr kleinen fluoreszenzmarkierten Fragmente der Sonde leicht durch die Zellen hindurch diffundieren und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen können.

Vor allem bei direkter *in situ*-PCR, also dem direkten Einbau gelabelter Nukleotide während der PCR, können durch die Reipareureigenschaften der Polymerase falsch-positive Ergebnisse durch den Einbau gelabelter Nukleotide in fragmentierte DNA auftreten (24).

Dieser Effekt wird in dem unter 3.3. ff beschriebenen Versuchsansatz durch die Verwendung spezifischer primer und einer hierzu passenden spezifischen Sonde umgangen. Die Verschiebung der R/Q-Ratio, also des Quotienten aus Fluoreszenzsignal von Reporter zu Quencher, ist vom Abbau der Sonde abhängig. Reparaturmechanismen, die außerhalb des die Sonde umschließenden Primerpaars liegen, beeinflussen insofern nicht das Ergebnis der TaqMan® basierten PCR-Methode.

Durch endogene DNA oder cDNA Fragmente können falsch-positive Ergebnisse erzielt werden. Beide Effekte sind abhängig von der DNA-Polymerase und Zykluszahl und treten auch bei Weglassen der primer und nach Hotstart auf (24).

Bei der unter 3.3. ff. beschriebenen Methode finden Umschrift und PCR direkt an hierzu präparierten Zellen (in situ-RT-PCR) statt. Vergleicht man die unter 3.3.1.1. und 3.3.1.3. erzielten Quotienten von Reporter und Quencher in der TAQ-Kontrolle (SK-BR-3-Zellen; Versuchsansatz mit TAQ-Polymerase statt reverser Transkriptase enthaltendem Enzym-Mix) mit der Positiv-Kontrolle (SK-BR-3-Zellen; Versuchsansatz mit Enzym-Mix) so ist ein Teil der erzielten Sondenhydrolyse sicherlich auch auf den Nachweis von DNA zurückzuführen.

Wie unter 3.3.1.3. beschrieben, zeigte sich nach 24stündiger Präparation der SK-BR-3-Zellen mit PermeaFix™ die vergleichsweise höchste Fluoreszenzintensität in der TAQ-Kontrolle. Dies könnte auf einen Zerfall der im Vergleich zur DNA vergleichsweise labileren RNA zurückzuführen sein und würde für einen DNA-abhängigen Anstieg des Quotienten von Reporter und Quencher, also für einen DNA-Nachweis sprechen.

Bei der unter 3.3.2. beschriebenen Laserscanmikroskopie der unter 3.3.1.3. verwendeten Zellen zeigte sich auch über den Zellkernen ein deutliches Fluoreszenzsignal. Dies spricht ebenfalls dafür, dass DNA beim direkten Einsatz an hierzu präparierten Zellen zumindest mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls als Matrize gedient hat.

4.4. Probanden und Patienten

- Wird ErbB2 auch bei Gesunden exprimiert?

Auffällig war die Tatsache, dass auch bei gesunden Probanden ErbB2-RNA nachgewiesen werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass eine Expression von ErbB2 zumindest auf geringem Niveau auch bei gesunden Menschen vorkommt.

Wie im Bluteinmischversuch unter 3.1.6.2. und 3.2.3. beschrieben, konnten deutliche Unterschiede in der ErbB2-Expression zum Probandenblut erst bei einer eingemischten Zellzahl von 10.000 SKBr3 Tumorkulturzellen festgestellt werden. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Expression von ErbB2-RNA auch bei gesunden Menschen auf einem vergleichsweise hohen Niveau stattfindet. Eine andere Erklärung wäre methodischer Art und könnte am Erreichen eines Sättigungsbereichs der PCR liegen. Hierbei würden bei Tumorzellen die stark exprimierten ErbB2-RNA-Fragmente nicht mehr weiter amplifiziert werden können, wohingegen die bei den gesunden Probanden minimal vorhandene ErbB2-

RNA im Vergleich hierzu an Menge noch weiter zunehmen kann. Bei insgesamt 42 Zyklen, in Form der nested-PCR durchgeführt gar 2mal 42 Zyklen, ist dies durchaus denkbar.

Bei gesunden Individuen ist jedoch keine erhöhte ErbB2-Rezeptordichte auf den Zelloberflächen nachweisbar.

Möglicherweise greifen hier Schutzmechanismen an, die die Translation oder den Einbau in die Zellmembran verhindern. Denkbar wäre dies z. B. über Schutzproteine, welche eine rasche Elimination von ErbB2-Rezeptoren noch vor deren Einbau in die Zellmembran intrazellulär katalysieren. Alternativ könnte z. B. auch die Transskription von ErbB2-mRNA durch Anlagerung von Proteinen an die Ribosomen blockiert werden.

Um hier Klarheit zu erhalten erscheinen weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv sinnvoll, da die Beobachtung der ErbB2-Expression in gesunden Probanden an einem sehr kleinen Kollektiv angestellt wurde. Hierzu könnte die unter 3.2. ff beschriebene RT-PCR Methode verwendet werden. Um Probleme mit dem Sättigungsbereich zu vermeiden sollten weitere Untersuchungen jedoch bevorzugt mittels einer real-time RT-PCR-Methode durchgeführt werden.

Bei den untersuchten Patientinnen konnte im Vergleich zu gesunden Probanden keine signifikante Amplifikation der ErbB2-mRNA festgestellt werden. Da jedoch lediglich maximal ein Drittel aller betroffenen Mammakarzinompatientinnen überhaupt in ihren Tumorzellen eine erhöhte ErbB2-Rezeptordichte aufweisen ist aufgrund der geringen Patientenzahl hier keine eindeutige Aussage zu treffen.

4.5. Die Bedeutung der Detektion von erbB2 positiven Zellen für die Therapie mit Trastuzumab

Etwa ein Drittel der Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom bildet auf der Zelloberfläche der Tumorzellen c-ErbB-2-Rezeptoren in großer Zahl aus (27). Da nur diese Patientinnen von einer Therapie mit Herceptin profitieren und weiterhin Hinweise darauf bestehen, dass es bei diesen Patientinnen unter der Therapie mit Tamoxifen zu einer reduzierten Überlebenszeit kommt, ist es vor der Einleitung entsprechender Therapieschemata notwendig, solche Patientinnen zu detektieren um sie einer optimalen Therapie unterziehen zu können.

Da die erhöhte Expression von ErbB2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche in kausalem Zusammenhang mit einer erhöhten ErbB2-Expression zu stehen scheint, könnten zur

Detektion die in dieser Arbeit unter 2.2.6. ff und 3.1. ff sowie 2.2.11. ff und 3.2. ff beschriebenen Methoden eingesetzt werden.

Vorteilhaft wäre hier eine möglichst einfache und dennoch aussagekräftige Methode, weshalb ich die unter 2.2.11. ff und 3.2. ff beschriebene Methode des Nachweises von RNA mit Hilfe der Taqman®-Sonde an isolierter RNA favorisiere. Zuvor sollte mit Hilfe des unter 2.2.12. beschriebenen Verfahrens das entnommene Blut mittels Dichtegradient einer Zellisolierung unterzogen werden.

5. Ausblick

In dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei gesunden Menschen ErbB2-RNA nachgewiesen werden kann. Auf geringem Niveau wird ErbB2 also auch bei gesunden Menschen gebildet. Da hier nur eine geringe Anzahl gesunder Probanden untersucht wurde, erscheinen weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv sinnvoll. Die hier unter 2.2.11. ff und 3.2. ff beschriebene RT-PCR-Methode eignet sich hierzu insofern gut, da sie schnell, einfach durchzuführen und relativ kostengünstig ist.

Die Problematik der in dieser Arbeit verwendeten Endpunktmessung liegt in dem möglichen Erreichen eines Sättigungsbereichs, der eine weitere Intensitätssteigerung des abgegebenen Fluoreszenzsignals nicht mehr zulässt. So ist bei zu hoher PCR-Zykluszahl die Gefahr gegeben, niedrige Ausgangsmengen fälschlicherweise zu hoch zu bestimmen, also falsch-positive Ergebnisse zu erhalten. Auf der anderen Seite birgt eine zu geringe PCR-Zykluszahl die Gefahr falsch-negativer Ergebnisse. Lösen kann man dieses Problem durch eine real-time RT-PCR, also durch eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenzintensitätsänderung während der PCR. Hierzu kann z. B. das AbiPrism-Gerät der Firma PE Applied Biosystems eingesetzt werden.

Ein weiterer Vorteil einer real-time RT-PCR ist eine gegenüber der in dieser Arbeit untersuchten Methode weitere Einsparung an Arbeitsschritten, da eine zusätzliche Messung der Fluoreszenzintensität im Fluorimeter entfällt. Es ist nur noch ein einziger Ansatz der zu untersuchenden Zellsuspension bis zum fertigen Ergebnis erforderlich.

Weitere Untersuchungen sollten also mit einer real-time RT-PCR durchgeführt werden, die auf der in dieser Arbeit beschriebenen Methodik aufgebaut sein könnte.

6. Zusammenfassung

Die in einer Reihe von menschlichen Karzinomen nachweisbare Überexpression des zur EGFR-Familie (epidermal growth factor receptor family) gehörenden Wachstumsfaktors ErbB2 stellt beim Mammakarzinom auch einen entscheidenden Prognosefaktor dar. ErbB2-abhängige Mammakarzinome zeigen eine Chemoresistenz gegenüber Apoptose vermittelnden Therapeutika wie Paclitaxel (Taxol), sind zumeist deutlich aggressiver und invasiver als Östrogen-Rezeptor-positive Tumoren und sprechen auf eine Therapie mit Anti-Östrogenen wie Tamoxifen kaum oder gar nicht an. Es ist daher notwendig, solche Patientinnen zu erkennen um suffiziente Therapieschemata erarbeiten zu können.

Hierzu habe ich in meiner Arbeit Methoden erarbeitet, mit denen ErbB2-mRNA, also die Ursache für eine erhöhte Rezeptordichte auf den Zelloberflächen nachgewiesen werden kann.

Zum semi-quantitativen ErbB2-mRNA Nachweis wurden kompetitive PCR-Methoden verwendet. Der zu untersuchenden RNA-Probe wurde hierbei zu Beginn der Untersuchung ein bis auf eine mittels Restriktionsenzym spaltbare, zentral gelegene Basensequenz exakt der zu untersuchenden Zielsequenz entsprechendes Oligonukleotid hinzugefügt.

Zunächst wurde eine klassische 2-Schritt-RT-PCR mit getrennter Umschrift der RNA in cDNA und 1. PCR sowie einer anschließenden 2., so genannten nested-PCR verwendet. Vereinfacht wurde dieses System durch Einführung einer 1-Schritt-RT-PCR, bei der Umschrift und 1. PCR ohne weitere Pipetierschritte direkt in einem Ansatz, respektive Reaktionsgefäß durchgeführt wurden. Gegenüber der klassischen 2-Schritt-RT-PCR zeigte sich diese Methode durch Zeit- und Materialeinsparung, Reduktion der Kontaminationsgefahr, vor allem aber durch eine verbesserte Empfindlichkeit aus, was den Nachweis bis zu einer RNA-Konzentration von 10 pg, also etwa einer Zelle ermöglichte.

Als schnell durchführbare, wenig störanfällige Alternative zur kompetitiven RT-PCR wurde basierend auf der 1-Schritt-RT-PCR dann ein 5'-Nuklease-Assay entwickelt. Hierbei wird dem Untersuchungsansatz ein speziell auf das spezifische Primerpaar abgestimmtes, doppelt fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (Sonde) hinzugefügt, welches sich hinter dem upstream-primer ($3' \rightarrow 5'$) an das template anlagert. Durch die 5'-3'-Exonukleasefähigkeit der Taq-Polymerase kommt es in der Elongationsphase der PCR zur Hydrolyse der Sonde und somit zu einer räumlichen Trennung der beiden, am 3'- und 5'-Ende platzierten Fluorophore. Bei Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) kann dann die bei intakter Sonde aufgrund der räumlichen Nähe durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückte Fluoreszenz des am 5'-Ende platzierten Fluorophors mit Hilfe eines Fluorimeters erfasst

werden. Mit dieser Methode gelingt mit nur einer kombinierten Umschrift und PCR durch direkte Messung im Fluorimeter noch der Nachweis von 100 pg ErbB2-mRNA, also von etwa 10 Zellen im Versuchsansatz.

Im Weiteren sollte schließlich hierauf aufbauend eine *in situ-RT-PCR* entwickelt werden. Bei den unterschiedlichen Zellpräparationen ließ sich jedoch keine Kombination aus Fixierung und Permeabilisierung finden, die einen Übertritt der eingesetzten Reagenzien in das Zellkompartiment, bei gleichzeitigem Schutz vor einer Diffusion der gebildeten Produkte durch die Zellmembran aus der Zelle heraus sowie eine Versiegelung des Zellkerns zum Schutz vor DNA-Amplifikation ermöglicht.

Bei entsprechender Zellpräparation konnte jedoch nach der PCR im zellfreien Überstand ErbB2-cDNA nachgewiesen werden, wodurch unter direktem Einsatz der vorbehandelten Zellen ein RNA-Nachweis auch ohne eine aufwendige RNA-Isolation gelingt. Somit hat man ein ideales Screening-Verfahren um schnell und kostengünstig eine zumindest semi-quantitative Aussage über den ErbB2-mRNA-Gehalt einer Probe zu erhalten. Berücksichtigt werden muss hier jedoch eine mögliche Verfälschung des Ergebnisses durch gleichzeitig mit amplifizierte DNA.

Diesbezüglich deutlich weniger störanfällig ist daher weiterhin die Untersuchung von isolierter RNA. Weitere Untersuchungen, z.B. in Form einer real-time-RT-PCR lassen sich ideal auf dieser Methode aufbauen.

7. Literaturverzeichnis

1. Schild Th.: Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie (1996), Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
2. Brandt B., Vogt U., Schlotter C.M., Jackisch C., Werkmeister R., Thomas M., von Eiff M., Bosse U., Assmann G., Zänker K.S.: Prognostic relevance of aberrations of the erbB oncogenes in breast, ovarian, oral and lung cancer: double-differential PCR for clinical diagnosis. *Gene* (1995) 159: 35-42
3. Förster V.Th. (1948), *Annals of Physics (Leipzig)* 2: 55-75
4. Rychlik W., et al.: *Nucleic Acids Research* (1990): 6409-6412
5. Harari D., Yarden Y.: Molecular mechanism underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* (2000) 19: 6102-6114
6. Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg
http://www.krebsinformation.de/body_tumormarker.html
7. Konsensusempfehlungen zum Einsatz neuer Prognosefaktoren für die adjuvante Therapie, St. Gallen, 1995.
8. Fisher B.: Biological and clinical considerations regarding the use of surgery and chemotherapy in the treatment of primary breast cancer. *Cancer* (1977) 4: 574-587
9. Stierer M., Smola M.G.: Mammakarzinom (Arbeitsgemeinschaft für Chirurgische Onkologie der Österreichischen Gesellschaft für Chirurgie),
<http://www.aco.at/manual/mamma/index.htm#01>
10. Engel J., Schubert-Fritschle G., Hölzel D.: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Mammakarzinome. Tumorzentrum München (2001),
<http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/mamma/homepage.html>

11. Bundesamt S (1997) Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4: Todesursachenstatistik in Deutschland. Metzler Poeschel, Stuttgart
12. Bundesamt S (1998) Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4: Todesursachenstatistik in Deutschland. Metzler Poeschel, Stuttgart
13. De Waal J.C., et. al.: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Mammakarzinome. Tumorzentrum München (2001),
<http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/mamma/homepage.html>
14. Armstrong K., Eisen A., Weber B.: Assessing the Risk of Breast Cancer. New England Journal of Medicine (2000) 342: 564–571
15. Dihua Yu, Mien-Chie Hung: Role of erbB2 in breast cancer chemosensitivity. BioEssays (2000) 22: 673-680
16. De Placido S., et al.: c-erbB2 expression predicts tamoxifen efficiency in breast cancer patients. Breast Cancer Research and Treatment (1998) 52: 55-64
17. Mendelsohn J., Baselga J.: The EGF receptor family as targets for cancer therapy. Oncogene (2000) 19: 6550-6565
18. Rötger A.: Entwicklung einer kompetitiv-differentiellen PCR-Methode zur molekularen Analyse von Amplifikation und Deletion der erbB-Onkogene. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (1995).
19. Rötger A.: Untersuchungen zur Rolle der c-erbB-2 Rezeptor-Tyrosinkinase bei der hämatogenen Metastasierung des Mammakarzinoms. Dissertation im Fachbereich Biologie der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (1998).
20. Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology (1987) 155, 335-350

21. Lellé R.: Stadieneinteilung gynäkologischer Tumoren (2002), <http://www.lellenet.de>
22. Journal of Clinical Oncology (2002) 20: 3628 – 2636
23. Fisher B.: Biological and clinical considerations regarding the use of surgery and chemotherapy in the treatment of primary breast cancer. Cancer (1977) 4: 574-587
24. Komminoth P., Heitz Ph.U., Long A.A.: In situ Polymerase Chain Reaction - general methodology and recent advances. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (Stuttgart)
25. Webster D.R.: The prognostic significance of circulating tumor cells: A 5-year Follow up study of patients with cancer of the breast. Canadian Medical Association Journal (1967) 96: 129-131
26. Mitas M. et al.: Quantitative real-time rt-pcr detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. International Journal of Cancer (2001): 93: 162–171
27. Schattenfroh, S: Herceptin bei Mammakarzinom: Test entdeckt Frauen, die von der Therapieform profitieren. Deutsches Ärzteblatt (2000) 97: A-3447 [Heft 50]
28. DocCheck®-Flexicon, <http://flexicon.doccheck.com/mrna>

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Brandt für die Bereitstellung des interessanten Themas, für seinen Ideenreichtum und die Begeisterung für die Forschung, die unweigerlich auf mich abgefärbt und die Arbeit im Labor zu einer stets interessanten und spannenden Zeit gemacht hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. H. J. Schulze für seine spontane Bereitschaft bedanken, sich als Koreferent anzubieten.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Onkologischen Chemie möchte ich mich bedanken für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Darüber hinaus danke ich meiner Mutter für die Unterstützung während meiner Promotionsarbeit.

Hiermit versichere ich, Michael Görz, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Stellen in der Arbeit, welche sinngemäß oder wörtlich die Arbeiten oder Ergebnisse anderer Verfasser wiedergeben, sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit weder in dieser, noch in ähnlicher Form bei einer anderen Abteilung dieser Hochschule oder einer entsprechenden Einrichtung einer anderen Hochschule eingereicht wurde.

Münster, 01.08.2004

Michael Görz

Lebenslauf

Name Michael Görz
Geboren am 07. März 1972 in Dortmund
Familienstand ledig
Konfession römisch - katholisch
Nationalität deutsch

Schulbildung / Zivildienst

1978 – 1982 Grundschule, Detmold
1982 – 1988 Heinrich Drake Realschule, Detmold
1988 – 1991 Stadtgymnasium, Detmold
Juli 1991 – Sept. 1992 Zivildienst in der Altenpflege, Altenpflegeheim, Lage

Ausbildung / Studium

Okt. 1992 – Sept. 1994 MTA-Fachschulausbildung / Fachrichtung Labor, Münster
Okt. 1994 – Sept. 2000 Medizinstudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Praktisches Jahr

Okt. 1999 - Feb. 2000 Dermatologie, Fachklinik Hornheide, Münster
Feb. - Mai 2000 Department of Internal Medicine, Tulane University, New Orleans, USA
Juni - Sept. 2000 Chirurgische Klinik , Kantonsspital Winterthur, Schweiz
Lehrkrankenhaus der Universität Zürich, Schweiz

Berufstätigkeit

seit 1999 Konzeption und Realisierung einer elektronischen Gesundheitsakte in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Jan. 2001 – Dez. 2002 Arzt im Praktikum und Assistenzarzt in der Abteilung für Dermatologie und Venerologie des St. Elisabeth Krankenhauses, Oberhausen

Okt. – Dez. 2002 Freier Mitarbeiter im Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Jan. – Dez. 2003 Assistenzarzt in der dermatologischen Abteilung der Fachklinik Bad Bentheim

seit Feb. 2004 Assistenzarzt in der Abteilung für Dermatologie der Fachklinik Hornheide, Münster

Auszeichnung

Juni 2001 eHealth Award 2001
für ein "Innovatives und zukunftsweisendes eHealth-Konzept für das Krankenhaus"

ehrenamtliche Tätigkeit

seit Sept. 2002 aktives Mitglied in der Bundesanstalt Technisches Hilfswerk

Münster, 01.08.2004 Michael Görz