

Aus dem Institut für Molekulare Medizin

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. G. Sczakiel

Detektion Extrazellulärer RNA zur Diagnostik des
Mammakarzinoms

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Anna-Lena Hoffmann

aus Hamburg

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Daniela Hornung

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2007

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06.11.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Für meinen Großvater Carl-Wilhelm Erasmi

1	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Tumorbiologie	1
1.1.1	Entstehung von Malignomen.....	1
1.1.2	Diagnostik und Prognosefaktoren beim Brustkrebs	3
1.1.3	Serologische Tumormarker beim Mammakarzinom.....	4
1.2	Nukleinsäuren als Tumormarker	5
1.2.1	Im Blut können Nukleinsäuren detektiert werden.....	5
1.2.2	Konzeptionelle Vorteile von extrazellulären Nukleinsäuren.....	10
1.3	Etablierung extrazellulärer RNA-Spezies als Tumormarker.....	11
1.3.1	Ausgewählte Ribonukleinsäurespezies als potentielle Mammakarzinommarker.....	11
1.3.2	<i>Housekeeping</i> -Gene zur Sicherstellung der Qualität von präparierter RNA	13
1.3.3	Bedeutung von Zellkulturen	14
1.4	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Patientenproben	16
2.2	Material.....	17
2.2.1	Chemikalien.....	17
2.2.2	Puffer	18
2.2.3	Enzyme	19
2.2.4	Medien und Wachstumsfaktoren	19
2.2.5	Kits	20
2.2.6	Sonstiges.....	20
2.3	Geräte.....	20
2.4	Methoden	22
2.4.1	Gelelektrophorese.....	22
2.4.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	23
2.4.3	RNase-Kontaminationstest	24
2.4.4	Zellkultur	24
2.4.5	RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen	26
2.4.6	RNA-Isolierung aus Leukozyten	28
2.4.7	cDNA-Synthese	30
2.4.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31

2.4.9	Isolierung von RNA aus Serum.....	32
2.4.10	Klonierung von Standards für die quantitative PCR.....	33
2.4.11	Quantitative PCR.....	40
2.4.12	Statistische Auswertung	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Detektion von intrazellulären RNA-Spezies in Zellkultur	46
3.1.1	Auswahl eines Primerpaares für Hoj-1.....	46
3.1.2	Qualitativer Nachweis von Hoj-1, Rad51, Ki-67 und GAPDH in verschiedenen Zelllinien	48
3.1.3	Eignung von GAPDH als interner Standard.....	53
3.1.4	Quantitative Unterschiede der Expression von Hoj-1, Rad51 und Ki- 67 in verschiedenen Zelllinien	54
3.1.5	Expressionsmuster der vier detektierten mRNA-Spezies in den beiden Mammakarzinom-Zelllinien	56
3.2	Überprüfung von intrazellulärer RNA aus Leukozyten auf das Vorhandensein der gesuchten mRNA-Spezies.....	58
3.2.1	In Leukozyten ist qualitativ nur GAPDH nachweisbar.....	58
3.2.2	Die quantitative PCR bestätigt bei Leukozyten das Ergebnis der konventionellen PCR	59
3.3	Analyse von ausgewählten RNA-Spezies in extrazellulärer RNA aus dem Serum von Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen	60
3.3.1	GAPDH-Bestimmung.....	60
3.3.2	Ki-67-Bestimmung	61
3.3.3	Rad51-Bestimmung.....	63
3.3.4	Hoj-1-Bestimmung	64
3.3.5	Unterschiede der Serum-RNA zwischen hormonabhängigen und hormon-unabhängigen Tumoren.....	66
3.3.6	Korrelieren in den einzelnen Proben GAPDH, Ki-67, Rad51 und Hoj- 1 miteinander?.....	68
4	Diskussion	69
4.1	Zellkulturergebnisse	69
4.2	Bedeutung der RNA-Expression in Leukozyten	70
4.3	Bestimmung der mRNA-Marker im Serum	71
4.3.1	Ki-67.....	72

4.3.2	Rad51	72
4.3.3	Hoj-1	73
4.3.4	GAPDH	73
4.4	Vergleich der Zellkulturergebnisse mit denen aus Serum.....	74
4.5	Eignung eines Arrays zur Etablierung neuer Tumormarker.....	75
4.6	Diagnostische Anwendbarkeit des Verfahrens mit Diskussion möglicher Fehlerquellen	76
4.6.1	Blutentnahme.....	76
4.6.2	Behandlung der Serumröhrchen	76
4.6.3	RNA-Isolierung	77
4.6.4	cDNA-Synthese	78
4.6.5	PCR.....	79
4.6.6	Auswertung.....	79
4.6.7	Biologische Ursachen	80
4.7	Vor- und Nachteile von RNA-Markern gegenüber DNA bei der klinischen Anwendung	81
5	Zusammenfassung.....	82
6	Literaturverzeichnis.....	83
7	Anhänge.....	93
7.1	Erklärung über die Genehmigung der Untersuchungen von der Ethikkommission	93
7.2	Abkürzungsverzeichnis	93
7.3	Quantitative PCR-Ergebnisse der einzelnen Serumproben	96
7.4	In der Auswertung verwendete Daten der Mammakarzinompatientinnen.....	99
7.5	Abbildungsverzeichnis	101
7.6	Tabellenverzeichnis	102
8	Danksagungen	103

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Tumorbiologie

1.1.1 Entstehung von Malignomen

Malignome sind in den westlichen Industrieländern die zweithäufigste Todesursache. Als Auslöser sind unter anderem chemische Verbindungen, Strahlenbelastung, Ernährungsfaktoren, chronische Infektionen und eine genetische Disposition bekannt. Diese Kanzerogene bewirken DNA-Veränderungen wie Strangbrüche, Mutationen oder Translokationen. Wird dadurch eine Fehlregulation des genetischen Programms einer Zelle ausgelöst, kann ein Tumorwachstum resultieren (Nowell, 1976). Die Entstehung eines Malignoms gilt dabei als Prozess, der in mehreren Schritten erfolgt (Hanahan und Weinberg, 2000). Die große Anzahl von verschiedenen Tumorzellgenotypen lässt sich auf sechs Änderungen der Zellphysiologie reduzieren: eine unregulierte Produktion von Wachstumsfaktoren, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Umgehung von programmiertem Zelltod, Fähigkeit zur unbegrenzten Replikation, Induktion von Angiogenese sowie Invasion von Gewebe und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000).

Gezeigt werden konnte bei den meisten Tumoren eine genetische Instabilität. Diese äußert sich unter anderem als veränderte Chromosomenzahl, Chromosomentranslokation, als Amplifikation einzelner Gene oder als Deletion oder Insertion einzelner Nukleotide (Lengauer et al., 1998). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass fast alle humanen Tumoren einen heterogenen Phänotyp aufweisen. Tumorzellen, die Mutationen in Genen der Replikationskontrolle aufweisen, werden als „Mutator-Phänotyp“ bezeichnet (Loeb, 1991). Genetische Instabilität bewirkt eine Kaskade von Mutationen im gesamten Genom (Loeb, 2001). Aus therapeutischer Sicht verdeutlicht die Theorie der genetischen Instabilität ein Problem der Tumorbehandlung, beispielsweise mit Chemotherapie: Einzelne Tumorzellen mit Mutationen, die eine Therapieresistenz bewirken, können bevorzugt proliferieren und zu einem Tumorrezidiv führen (Loeb et al., 2003).

Bei über 50% aller Tumoren liegt eine Mutation des TP53-Gens vor (Levine, 1997). Das TP53-Protein wird im normalen Zellzyklus bei genetischen Schäden vermehrt synthetisiert und bewirkt über seine Zielgene eine Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen und eine Apoptose, wenn keine Reparatur möglich ist (Yonish-Rouach et al., 1991). Eine Mutation im TP53-Gen verhindert diesen Signalweg und ermöglicht eine Replikation trotz

DNA-Schäden. Auch ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie wurde bei Tumoren mit TP53-Mutationen gezeigt (Levine, 1997). Regelmäßig finden sich auch Mutationen im Tumorsuppressorgen P16, dessen Genprodukt ebenso wie TP53 einen Arrest des Zellzyklus bewirkt (Liggett und Sidransky, 1998). Ein bedeutender Mechanismus zur Hemmung der Expression von Tumorsuppressorgenen ist die Hypermethylierung von CPG-Inseln im Promotorbereich (Baylin et al., 1998). Typischerweise beim Mammakarzinom mutierte Tumorsuppressorgene sind das BRCA-1-Gen (Miki et al., 1994) und das BRCA-2-Gen (Wooster et al., 1995). Eine Mutation eines dieser beiden Gene als vererbte Disposition liegt in 5-10% der Brustkrebsfälle vor.

Zu den bedeutendsten humanen Onkogenen gehören die Proteine der ras-Familie. Es handelt sich dabei um GTP-bindende Proteine, deren Funktion in der Kontrolle von Proliferation, Differenzierung, Apoptose und der Organisation des Zytoskeletts besteht. Veränderungen der ras-Proteine können bei bis zu 30% aller Tumoren nachgewiesen werden und sind dabei unter anderem an der Metastasierung beteiligt (Hernandez-Alcoceba et al, 2000).

Die wichtigsten Merkmale maligner Tumoren sind die Invasion und Metastasierung. Voraussetzung zum invasiven Wachstum ist das Auflösen von Zell-Zell-Kontakten, der Umbau extrazellulärer Gewebematrix und die aktive Bewegung der Tumorzellen. Eine Metastasierung erfolgt als Kaskade in mehreren Stufen: Nach dem Austritt aus dem Primärtumor erfolgt das Eindringen in die Metastasierungswege, die Verschleppung der Tumorzellen und der Austritt aus den Metastasierungswegen. Es konnte gezeigt werden, dass ein Primärtumor unterschiedliche Subpopulationen mit metastatischen und nicht-metastatischen Tumorzellen enthält (Fidler, 1990). Diese Subpopulationen weisen Unterschiede in der Genexpression auf (Yokota, 2000).

Entscheidend für das Überleben von Zellen ist der Anschluss an Blutgefäße. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen in die Apoptose übergehen, wenn die Entfernung zum Blutzufuhr über 100µm beträgt. Dadurch ist das Anwachsen eines Tumors ohne Angiogenese auf 10^6 Zellen beschränkt (Folkman, 1990). Angiogenese wird durch Tumorzellen induziert: Diese exprimieren Tumor-Angiogenese-Faktoren, die benachbarte Kapillaren zur Aussprossung stimulieren. Eine TP53-Mutation hat ebenfalls Auswirkungen auf die Angiogenese. So supprimiert TP53 im normalen Zellzyklus über das Glykoprotein Thrombospondin ein Wachstum von Blutgefäßen, und bei Mutationen entfällt diese Angiogenese-Hemmung (Dameron et al., 1994). Auch in vitro konnte Angiogenese demonstriert werden (Folkman und Haudenschild, 1980). Beim Mammakarzinom wurde

gezeigt, dass eine intensive Neovaskularisation des Tumors mit Metastasierung korreliert (n=49, Weidner et al., 1991).

1.1.2 Diagnostik und Prognosefaktoren beim Brustkrebs

Die Routinediagnostik zur Brustkrebserkennung besteht aus klinischen Untersuchungen wie der Inspektion und Palpation, aus bildgebenden Verfahren sowie bei Malignitätsverdacht aus Stanzbiopsien mit histologischer Untersuchung.

Zu den prognostischen Faktoren, die sich aus der Morphologie des Tumors ableiten, gehören der Tumortyp, die Tumorgöße, das Grading, die vaskuläre Versorgung des Tumors, der Resektionsrand und der Lymphknotenstatus (Ross und Fletcher, 1998). Das Tumorstadium und der axilläre Lymphknotenstatus werden nach dem TNM-System klassifiziert. Die histologische Beurteilung erfolgt nach WHO-Kriterien, wobei über 20 verschiedene Typen unterschieden werden. Am häufigsten tritt das duktal invasive Karzinom auf. Als Grading-Verfahren hat sich das System von Bloom bewährt, das durch zusätzliche Kriterien wie die Mitoserate eine Klassifikation in Grad 1 (= gut differenziert), Grad 2 (= mäßig differenziert) und Grad 3 (= schlecht differenziert) erlaubt (Bloom und Richardson, 1957). Alternativen dazu stellen das System nach Elston und Ellis oder der Nottingham-Score dar. In letzterem wird eine Prognose über die 15-Jahres-Überlebenszeit anhand eines Indices aus der Tumorgöße, Grading und Lymphknotenstatus ermöglicht (Galea et al., 1992).

Nicht-morphologische Prognosefaktoren sind der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, der Zellproliferationsindex, der Anteil an Tumorzellen in der Synthesephase, der Ploidiegrad der DNA sowie das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren, Onkogenen (HER-2/neu, myc, ras), mutierten Tumorsuppressorgenen (TP53), Proteasen (Kathepsin D) und den Zellzyklusregulatoren Zykline und zyklinabhängige Kinasen (Ross und Fletcher, 1998). Der Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus wird immunhistochemisch im Paraffinschnitt bestimmt und in einem Score von eins bis zwölf bewertet, wobei ein Score >2 (entsprechend 10-20 fmol/mg Tumorprotein) als Rezeptor-positiv gilt (Jonat et al., 1986). Ein Tumor gilt als hormonrezeptorpositiv, wenn ein positiver Östrogen- oder Progesteronrezeptorstatus vorliegt. Dieses wird als prognostisch günstig bewertet. Das Onkoprotein erbB-2 (HER-2), ein transmembraner Tyrosinkinase-Rezeptor, hat ebenfalls prognostische Bedeutung: Eine Überexpression korreliert mit einem reduzierten Gesamtüberleben, erhöhter Rezidivneigung und einem negativen Hormonrezeptorstatus (Ross und Fletcher, 1998).

Arrayanalysen ergaben, dass die Untersuchung des Genexpressions-Profiles anhand zellulärer RNA im Tumorgewebe prognostisch aussagekräftig ist (n=42, Perou et al., 2000; n=98, van't Veer et al., 2002; n=55, Ahr et al., 2002; n=295, van de Vijver et al., 2002). Invasive Mammakarzinome (n=78) konnten anhand der Transkriptionsprofile in Gruppen eingeteilt werden, die unterschiedlich auf die systemische Therapie ansprechen und verschiedene Überlebenswahrscheinlichkeiten aufweisen (Sorlie et al., 2001). Auch Prognosen über das Potential zur Metastasierung scheinen bei Adenokarzinomen wie dem Mammakarzinom durch RNA-Analysen möglich zu sein (n=279, Ramaswamy et al., 2003). Als mögliche klinische Anwendung wurde die Durchführbarkeit von Arrayanalysen mit RNA aus Feinnadelaspiraten gezeigt (n=27, Assersohn et al., 2002).

Eine wichtige Bedeutung könnte die Genexpressionsanalyse bei kleinen östrogenrezeptorpositiven Tumoren ohne Lymphknotenbefall erlangen, die nach bisheriger Definition eine günstige Prognose haben. Denn auch bei Tumoren dieser Kategorie kommen progrediente Verläufe vor, die bislang nicht prognostiziert werden konnten. Basierend auf der Expression von 21 RNA-Spezies im Tumorgewebe war es jedoch auch bei diesem Patientenkollektiv (n=668) möglich, genaue Voraussagen zu treffen (Paik et al., 2004).

Alle in der Routine verwendeten Marker, die Aussagen über die Diagnose oder die Prognose erlauben, werden jedoch bislang aus Tumorgewebe gewonnen. Somit ist eine Biopsie oder Operation des Tumors nötig, bevor molekularbiologische Methoden möglich sind.

1.1.3 Serologische Tumormarker beim Mammakarzinom

Beim Mammakarzinom wurden verschiedene Serum-Tumormarker getestet. Dazu gehören CEA, CA15-3, CA27.29, TPA, TPS und die extrazelluläre Domäne von HER-2. Die Sensitivität und Spezifität erwiesen sich jedoch bei allen Markern als zu niedrig für die Anwendung zur Brustkrebs-Früherkennung (Duffy, 2006).

Lediglich zur Therapiekontrolle konnten bislang zwei Marker etabliert werden, CEA und CA 15-3. CEA ist ein onkofetales Antigen aus embryonalem Gewebe, das von einigen Tumoren sezerniert wird. Erhöhte CEA-Werte kommen bei 30-50% der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom vor, jedoch auch bei benignen Erkrankungen (Cheung et al., 2000). Das Glykoprotein MUC1 wird üblicherweise durch einen Assay als Krebsantigen CA15-3 detektiert. Im Serum ist CA15-3 bei der Mehrzahl der Frauen mit metastasiertem Brustkrebs erhöht. Aber auch bei anderen Malignomen sowie bei

verschiedenen gutartigen Erkrankungen kommen CA15-3-Erhöhungen vor (Cheung et al., 2000).

Vorteile serologischer Brustkrebsmarker zur Therapiekontrolle im Vergleich zu konventionellen Kriterien sind unter anderem eine höhere Sensitivität, eine größere Objektivität bei der Messung, eine gute Reliabilität sowie die Kosteneffizienz (Duffy, 1999; Cheung et al., 2000). Eine Primärdiagnostik des Mammakarzinoms ist mit keinem bislang bekannten Marker möglich. Da der Brustkrebs jedoch zu den Tumoren mit häufiger und frühzeitiger hämatogener Aussaat gehört, erscheinen weitere Untersuchungen in diesem Gebiet aussichtsreich. Zuverlässige Tumormarker, die sich für ein serologisches Screening eignen, gilt es dabei für das Mammakarzinom noch zu etablieren.

1.2 Nukleinsäuren als Tumormarker

1.2.1 Im Blut können Nukleinsäuren detektiert werden

1.2.1.1 Bei Krebspatienten sind im Blut zirkulierende Tumorzellen nachweisbar

Das Wissen um die Existenz zirkulierender Tumorzellen im Blut hat seinen Ursprung bereits im Jahr 1869, als Ashworth seine Ergebnisse über Untersuchungen mit dem Blut Verstorbener publizierte (Ashworth, 1869). Zirkulierende Tumorzellen im Blut von lebenden Patienten wurden 65 Jahre später erstmals nachgewiesen (Pool und Dunlop, 1934).

Anfangs erfolgte der Nachweis lichtmikroskopisch. Mittlerweile werden die Zellen des Blutes pelletiert und anschließend entweder RNA oder DNA zur Analyse zu präpariert. Alternativ werden tumorspezifische Zelloberflächenmarker immunhistochemisch bestimmt. Die Sensitivität ist besonders bei den molekularbiologischen Techniken hoch; eine bis sieben Tumorzellen pro ml Serum oder eine Tumorzelle pro 10^5 - 10^6 normale Zellen sind nachweisbar (Garcia-Olmo et al., 2005). Bei Malignomen konnte festgestellt werden, dass täglich im Durchschnitt 10^6 Zellen pro Gramm Tumorgewebe in die Blutzirkulation übergehen (Carmeliet und Jain, 2000).

Im Jahre 1991 gelang es der Arbeitsgruppe um B. Smith erstmals, bei Melanompatienten tumorspezifische RNA mit einer „nested-PCR“ im peripheren Blut nachzuweisen. Dabei wurde Tyrosinase mRNA detektiert, die nur in Melanozyten transkribiert wird und ein Schlüsselenzym der Melaninsynthese codiert. Die gesuchte RNA-Spezies konnte im Blut von 57% der Patienten (n=7), aber bei keinem gesunden Probanden (n=4) nachgewiesen werden (Smith et al., 1991).

Bei Patientinnen mit Mammakarzinomen wurden unter anderem folgende nicht-brustgewebespezifische mRNA-Spezies als Marker für zirkulierende Tumorzellen verwendet: CK-19, die RNA der Sekretionsproteine p1B, PS2 und EGP2 (n=103, Bosma et al., 2002), CEA (n=33, Wong et al., 2001), EGF-R (n=133, Grünewald et al., 2000), PTHrP (n=31, Wulf et al., 1997), HER2/neu (n=17, Wasserman et al., 1999), die mRNA des Onkogen-Rezeptors c-Met, $\beta 1 \rightarrow 4$ -N-acetylgalactosaminyl-transferase, tumorassoziiertes Antigen MAGE-A3 (n=65, Taback et al., 2001) und β -HCG (n=65, Taback et al., 2001; n=55, Fabisiewicz et al., 2004).

Untersucht wurde außerdem hMAM als Marker-mRNA. Diese Spezies gehört zur Uteroglobulin-Genfamilie und wird ausschließlich in der Mamma exprimiert. Bei einem Teil der Tumoren wird im Brustkrebsgewebe eine Überexpression beobachtet (n=35, Watson und Fleming 1996; n=100, Watson et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass hMAM-mRNA im Blut einiger Mammakarzinompatientinnen nachweisbar ist und dort mit dem Lymphknotenstatus und dem Vorhandensein von Fernmetastasen korreliert. Im Blut von gesunden Probandinnen konnte hMAM-mRNA nicht detektiert werden (Watson et al., 1999).

EGF-R ließ sich hingegen auch im Blut von hämatologischen Tumorpatienten nachweisen, CK-19, p1B, PS2 und EGP2 sogar zusätzlich bei einigen Gesunden (n=31, Grünewald et al., 2000; n=96, Bosma et al., 2002). Eine Erhöhung der Spezifität konnte durch PCR-Assays mit mehreren Markern erreicht werden (Taback et al., 2001; Gilbey et al., 2004).

Die klinische Bedeutung dieser Mikrometastasen wird noch kontrovers diskutiert. Eine Untersuchung zirkulierender Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen (n=19) zeigte, dass die Mehrheit der Zellen Apoptose-typische DNA-Strangbrüche aufwies (Mehes et al., 2001). Andererseits wurde eine statistisch signifikante Verkürzung der Überlebenszeit bei Mammakarzinompatientinnen mit zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut nachgewiesen (n=94, Weigelt et al., 2003; n=177, Cristofanilli et al., 2004).

1.2.1.2 Auch extrazelluläre DNA kann im Blut bestimmt werden

Bereits im Jahre 1948 wurde erstmals von der Existenz zirkulierender zellfreier DNA und RNA im Blutplasma von 25 Menschen berichtet (Mandel und Metais, 1948). Knapp 30 Jahre später beschrieb S.A. Leon, dass Tumorpatienten (n=173) im Vergleich zu Gesunden (n=55) erhöhte DNA-Mengen im Serum aufweisen. Eine indirekte Quantifizierung mit einem Radioimmunoassay ergab bei gesunden Kontrollpersonen im Mittel 13ng DNA/ml

Serum und bei Tumorpatienten durchschnittlich 180ng/ml. Zwischen der DNA-Konzentration und der Tumorgröße oder –Lokalisation konnte kein Zusammenhang gesehen werden. Bei Patienten mit einem metastasierten Tumor waren die DNA-Konzentrationen im Serum jedoch signifikant höher und lagen durchschnittlich bei 209ng/ml Serum (Leon et al., 1977). Eine andere Studie zeigte, dass Patienten mit malignen Erkrankungen des Verdauungstraktes (n=199) signifikant höhere DNA-Konzentrationen im Serum haben als Patienten mit benignen gastrointestinalen Erkrankungen (n=187, Shapiro et al., 1983). Dass die erhöhten DNA-Konzentrationen zumindest zum Teil aus dem Tumorgewebe stammen, wurde 1994 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, die jeweils tumorspezifische Punktmutationen im ras-Gen mit einer PCR aus freier DNA des Serums detektierten (n=4, Sorensen et al., 1994; n=10, Vasioukhin et al., 1994). Bei Quantifizierungen wurde festgestellt, dass der Anteil von Tumor-DNA an der Gesamt-DNA im Plasma bei Patienten mit verschiedenen Malignomen (n=30) zwischen 3% und 93% beträgt. Ein Zusammenhang mit der Konzentration der Gesamt-DNA lässt sich daraus nicht ableiten (Jahr et al., 2001b).

Aufgeklärt wurde bislang weder der Mechanismus, mit dem DNA in den Blutkreislauf eingeschleust wird, noch die Rolle der freien Tumor-DNA bei der Metastasierung. Die Effizienz einer Zelltransformation durch extrazelluläre DNA ist *in vitro* zwar gering, doch dies muss nicht für die Situation *in vivo* gelten.

Es gibt Hinweise darauf, dass Tumor-DNA in Apoptosekörperchen oder als freie Plasma-DNA eine Rolle bei der Metastasierung spielen könnte. So konnte im Zellkultursystem eine Aufnahme von Apoptosekörperchen durch somatische Zellen gezeigt werden, auch die erneute Transkription der darin enthaltenen DNA ist möglich (Holmgren et al, 1999). In einer anderen Studie konnten native Tumorzellen durch Inkubation in Plasma mit zirkulierender Plasmid-DNA transfiziert werden. Nach Injektion dieser Zellen in gesunde Ratten konnte die Plasmid-DNA einige Wochen später im Lungengewebe nachgewiesen werden. Aus diesen Experimenten leiteten die Autoren die Genometastasen-Hypothese ab: Nach dieser Theorie ist eine Metastasierung möglich, wenn der Primärtumor dominante Onkogene ins Plasma abgibt und diese in dafür empfängliche Zellen der Zielorgane transfiziert werden (Garcia-Olmo et al., 1999; Garcia-Olmo et al., 2000).

In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Nukleinsäuren im Blut nicht nur in zirkulierender Form vorliegen, sondern auch über Membranproteine an Zelloberflächen von Leukozyten und Erythrozyten gebunden sein können (Bennett et al., 1985). Zumindest bei gesunden Menschen (n=25) ist im Blut der Hauptanteil der extrazellulären

Nukleinsäuren an Zelloberflächen gebunden (Tamkovich et al., 2005). Am Beispiel methylierter DNA-Sequenzen wurde nachgewiesen, dass bei Brustkrebs-Patientinnen (n=20) und Frauen mit einem benignen Fibroadenom (n=15) im Vergleich zu gesunden Frauen (n=10) der Anteil an frei zirkulierender DNA steigt, während der Anteil an zellgebundener DNA sinkt (Skvortsova et al., 2006).

Freie Tumor-DNA kann zumindest im Tiermodell (n=70) signifikant häufiger im Plasma detektiert werden als zirkulierende Tumorzellen (Garcia-Olmo et al., 2005). Folglich scheinen freie Nukleinsäuren das Potential zur sensitiveren Malignomdiagnostik zu haben als zirkulierende Tumorzellen.

Mammakarzinome gelten bereits seit den siebziger Jahren als einer der Tumoren mit der mit den höchsten DNA-Konzentrationen im Serum (n=173, Leon et al., 1977). Auch in folgenden Studien wurde im Plasma oder Serum von Brustkrebspatientinnen regelmäßig Tumor-DNA nachgewiesen. Voraussetzung für die Amplifikation von Tumor-DNA aus Serum ist das Vorhandensein von Karzinom-spezifischen Genveränderungen. Als DNA-Abnormalitäten wurden im Blut von Patientinnen mit Mammakarzinom unter anderem Mikrosatelliten-Veränderungen (n=61, Chen et al., 1999; n=17, Mayall et al., 1999; n=62, Silva et al., 1999a; n=71, Shaw et al., 2000), Mutationen vom p53-Gen (n=25, Silva et al., 1999c) und Promoter-Hypermethylierungen (n=35, Silva et al., 1999b) beschrieben. In den Studien, die eine gesunde Kontrollgruppe mitführten, betrug die Spezifität der DNA-Abnormalitäten 100%, die Sensitivität lag zwischen 14% und 61% (Goessl, 2003).

Eine Veröffentlichung belegte einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Tumor-DNA im Plasma und dem Befall von mindestens drei Lymphknoten, der histologischen Klassifikation als duktal invasives Karzinom sowie einem hohen Proliferationsindex gemessen an Ki-67 (Silva et al., 1999a). Diese Korrelationen konnten jedoch in anderen Studien nicht festgestellt werden (Chen et al., 1999; Shaw et al., 2000). Eine weiterer statistisch signifikanter, aber nicht klinisch relevanter Zusammenhang wurde zwischen der Anwesenheit von Tumor-DNA im Plasma und der Länge der Remissionszeit publiziert (n=147, Silva et al., 2002b). Bei Messungen der Gesamt-DNA im Serum stellte sich hingegen eine höhere Konzentration als prognostisch günstiger heraus (n=96, Gal et al., 2004).

1.2.1.3 Detektion von zellfreier RNA im Blut

Obwohl im Blut RNAsen vorhanden sind (Kamm und Smith, 1972), kann zellfreie RNA im Serum oder Plasma nachgewiesen werden und die Konzentration bleibt auch über mehrere

Stunden stabil. Exogen zugegebene RNA wird hingegen innerhalb von Sekunden abgebaut (Tsui et al., 2002). Filtrationsversuche erbrachten die Theorie, dass RNA im Blut an Partikel gebunden ist (Ng et al., 2002).

Eine Hypothese besagt, dass Plasma-RNA in apoptotischen Körperchen zirkuliert und dadurch vor Degradation geschützt ist (Biggiogera et al., 1998; Hasselmann et al., 2001). Gestützt wird diese Annahme durch Zellkulturversuche, in denen Apoptose induziert wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass es zwei Gruppen von apoptotischen Körperchen gibt: Der eine Typus enthält RNA und der andere DNA (Halicka et al., 2000). Andere Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass RNA im Serum durch Komplexbildung mit Proteinen oder Lipoproteinen vor RNasen geschützt wird (Wieczorek et al., 1985; Bazanova und Seits, 1989). Auch über einen Degradationsschutz durch RNA-DNA-Bindungen wurde diskutiert (Sisco, 2001). Dagegen sprechen jedoch Versuche mit RNase-H, bei denen kein Effekt nachweisbar war (El-Hefnawy et al., 2004).

Die Konzentration zirkulierender RNA im Plasma beträgt durchschnittlich 1-10µg/L (El-Hefnawy et al., 2004). Ob extrazelluläre RNA eine biologische Funktion hat und worin diese besteht, wird kontrovers diskutiert. Eine Möglichkeit besteht in einer immunologischen Funktion, da die Aktivierung dendritischer Zellen durch extrazelluläre RNA gezeigt werden konnte (Ni et al., 2002). Aber auch eine Rolle beim Tumorwachstum oder der Metastasierung ist denkbar. Denn ebenso wie bei freier DNA konnte auch für zirkulierende RNA gezeigt werden, dass im Serum oder Plasma von Krebspatienten (n=16) höhere Konzentrationen messbar sind als im Blut Gesunder (n=27, Ng et al., 2002).

Zirkulierende RNA bietet eine viel versprechende Perspektive als Tumormarker: Verschiedene RNA-Spezies werden jeweils nur in einem bestimmten Gewebe transkribiert oder sind speziell in Tumorzellen überexprimiert. Diese Sequenzen können bei der Untersuchung von RNA in Körperflüssigkeiten gezielt detektiert werden. Eine Abhängigkeit von Mutationen wie bei der DNA-Analyse entfällt durch die Verwendung von RNA.

Eine der ersten Publikationen zur Eignung von extrazellulärer RNA bei der Tumordiagnostik stammt aus dem Jahre 1999, als eine Arbeitsgruppe bei vier von sechs Patienten mit malignem Melanom im Serum Tyrosinase mRNA nachweisen konnte, jedoch bei keiner der 20 gesunden Kontrollpersonen (Kopreski et al., 1999).

Ein anderer potentieller Tumormarker ist die Telomerase. Das Enzym synthetisiert als spezialisierte Reverse Transkriptase die DNA der Telomerregion und ermöglicht dadurch eine beliebig häufige Zellteilung. Die Telomerase hat zwei RNA-Untereinheiten: hTR und

hTERT. In humanen Zellen ist die Telomeraseexpression herunterreguliert, eine Ausnahme bilden dabei die Keimbahnzellen der Testes und Ovarien sowie alle bisher untersuchten Karzinome und Leukämien (Kim et al., 1994; Shay und Bacchetti, 1997). Beim Brustkrebs konnte eine Arbeitsgruppe bei 17 von 18 Patientinnen im Tumorgewebe hTR und hTERT detektieren und fand diese Transkripte anschließend bei einem Viertel der Frauen im Serum wieder, jedoch bei keiner gesunden Kontrollperson (n=21, Chen et al., 2000). Dasi zeigte ein Jahr später durch eine real-time PCR, dass Patienten mit kolorektalem Karzinom (n=9) oder Lymphom (n=9) signifikant höhere Konzentrationen von hTERT-Transkripten im Plasma aufweisen als gesunde Menschen (n=10, Dasi et al., 2001).

Mit den Markern CK19 und Mammaglobin stellte Silva fest, dass im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (n=25) bei signifikant mehr Brustkrebspatientinnen (n=45) mindestens einer dieser Marker im Serum detektierbar war. Eine statistisch signifikante Korrelation wurde zwischen dem Vorhandensein dieser Marker und der Tumorgröße sowie dem Ki-67-Gehalt der Zellen als Proliferationsindex gefunden (Silva et al., 2001).

1.2.2 Konzeptionelle Vorteile von extrazellulären Nukleinsäuren

Durch Früherkennung kann die Zahl der tödlichen verlaufenden Tumorerkrankungen gesenkt werden. Deswegen kommt Screeningverfahren eine bedeutende Rolle zu. Die Bestimmung von tumorassoziierten Nukleinsäuren in Körperflüssigkeiten stellt dabei eine aussichtsreiche Methode zur Frühdiagnostik dar. Der wichtigste Vorteile gegenüber gebräuchlichen Vorsorgemaßnahmen ist die minimal invasive Anwendung: Lediglich eine Blutentnahme wäre nötig. Damit könnte eine breitere Akzeptanz des Verfahrens in der Öffentlichkeit erlangt werden, als es bislang beispielsweise bei Mammographien zur Brustkrebsfrüherkennung möglich ist. Für die Anwendung extrazellulärer Nukleinsäuren spräche zudem eine bei geeigneten Markern frühzeitige Sensitivität.

Während die DNA das Genom darstellt und damit in allen Zellen eines Organismus identisch ist, steht RNA für das Transkriptom und unterscheidet damit verschiedene Zellen voneinander. Speziell beim Brustkrebs wurde zudem festgestellt, dass freie RNA im Plasma eine sensitivere Diagnostik ermöglicht als freie DNA. In einer Studie erwiesen sich RNA-Marker zudem nicht nur als sensitiver, sondern es ließ sich auch im Gegensatz zur Untersuchung mit DNA-Markern eine Korrelation mit Parametern der Aggressivität des Tumors nachweisen (n=45, Silva et al., 2002a).

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass die RNA-Analyse im Serum der Detektion von freier DNA und von Tumorzellen überlegen zu sein scheint. Aus diesem Grunde ist es ein

Ziel dieser Arbeit, ausgewählte RNA-Spezies im Serum auf ihr Potential als neue Tumormarker zu überprüfen.

1.3 Etablierung extrazellulärer RNA-Spezies als Tumormarker

1.3.1 Ausgewählte Ribonukleinsäurespezies als potentielle Mammakarzinommarker

1.3.1.1 extrazelluläre Ki-67-RNA hat Bedeutung beim Harnblasenkarzinom

Das Ki-67-Protein ist ein etablierter Proliferationsmarker im Nukleus und Nukleolus, der in allen aktiven Phasen des Zellzyklus nachweisbar ist, nicht aber in der G₀-Phase. Bei Krebserkrankungen korreliert der Anteil Ki-67-positiver Tumorzellen oft mit dem klinischen Verlauf der Krankheit. Das Mammakarzinom zählt dabei zu den am besten untersuchten Beispielen. Eine Überexpression der Ki-67-mRNA weist beim Brustkrebs auf eine schlechte Gesamtprognose hin. Die mRNA-Expression im Tumorgewebe korreliert mit dem Mitoseindex der Zellen, dem histologischen Grading des Tumors, dem Apoptoseindex, dem Gehalt an Östrogen- und Progesteronrezeptoren und einer Akkumulation von p53. Keine Korrelation besteht zwischen der Ki-67-Expression und dem Lymphknotenstatus, dem Vorhandensein von Metastasen zum Zeitpunkt der Operation sowie der Tumorgöße (n=191, Pietiläinen et al., 1996).

Eine Quantifizierung von Ki-67 mRNA aus Körperflüssigkeiten wurde bereits erfolgreich mit Urin durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung dieser mRNA-Spezies bei Patienten mit Harnblasenkarzinomen des histologischen Grades 2 (n=8) und 3 (n=9) im Vergleich zum Urin gesunder Menschen (n=14, Menke et al., 2004).

1.3.1.2 Rad51-RNA als bekannter intrazellulärer Marker beim Mammakarzinom

Das Rad51-Protein bildet einen Teil des Multiproteinkomplexes, dem auch der Tumorsuppressor BRCA-1 angehört (Scully et al., 1997). Bei Doppelstrang-DNA-Brüchen fungiert Rad51 als Reparaturgen. In den Nuclei von Tumorzellen wird es überexprimiert.

Bei Brustkrebspatientinnen (n=108) wurde eine Korrelation zwischen einer Rad51-Überexpression und dem histologischen Tumor-Grading beobachtet. Eine negative Korrelation besteht zum Östrogen-Rezeptorstatus der Tumoren. Des Weiteren verhält sich im Tumorgewebe die Expression von Rad51 gleichartig mit der von Ki-67 (Maacke et al., 2000).

Nachgewiesen werden konnte in Zellkulturexperimenten eine Assoziation von einer gesteigerten Rad51-Expression in Tumorzellen mit einer hohen DNA-Reparaturkapazität,

einer erhöhten Rekombinationsrate und der zunehmenden Resistenz gegen Radio- und Chemotherapie (Vispe et al., 1998; Yanasigawa et al., 1998). Die Gensequenz von Rad51 ist auf Chromosom 15q14 lokalisiert und enthält 10 Exons (Schmutte et al., 1999).

1.3.1.3 Hoj-1- RNA als viel versprechender unbekannter Marker

Bei Hoj-1 handelt es sich um den Namen eines nicht etablierten Markers, der als Synonym für c12orf2 gebraucht wird. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein Macroarray-Experiment mit dem Clontech Atlas™ human 8K plastic array durchgeführt (J. Warnecke, persönliche Mitteilung). Dazu wurde RNA aus dem Serum von zehn Patientinnen mit histologisch gesichertem, duktal-invasivem Mammakarzinom vereint und mit einer Macroarray-Analyse die Zusammensetzung der RNA untersucht. In einem Kontrollansatz wurde die zusammengeführte RNA aus dem Serum von zehn gesunden Frauen verwendet. Dabei war das Signal für Hoj-1 im Plasma von Brustkrebspatientinnen gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöht. Dieses Ergebnis könnte auf einen Zusammenhang zwischen freier Hoj-1-RNA im Serum und dem Vorhandensein eines Mammakarzinoms hinweisen. Allerdings wurden bei der Macroarray-Untersuchung gepoolte Proben untersucht. Erst ein Einzelnachweis von Hoj-1 im Serum kann zeigen, ob diese mRNA-Spezies mit dem duktal-invasiven Mammakarzinom korreliert.

In der Literatur ist Hoj-1 kaum erwähnt. Das Protein, für das Hoj-1 codiert, zeigt 56% Homologie mit B44478, einem putativen Regulator für Zellwachstum oder Differenzierung (Debeer et al., 2002). Beschrieben werden fünf verschiedene Spleißvarianten:

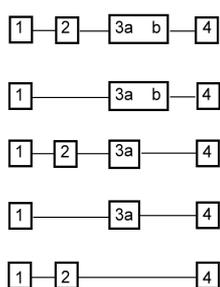


Abbildung 1: Spleißvarianten von Hoj-1

Hoj-1 enthält vier Exons. Dargestellt sind die fünf bekannten Spleißvarianten.

nach: Debeer et al., 2002

Eine vorherige Publikation dieser Arbeitsgruppe beschreibt einen Bereich von 1,5Mb auf Chromosom 12 p11.2, der auch den Genlocus von Hoj-1 umfasst. Darin sind die Ergebnisse eines Northern Blots abgebildet, bei dem verschiedene humane Gewebe auf die Expression von zwei verschiedenen Hoj-1-Genprodukten untersucht wurden. Die Genprodukte galten in dieser Publikation noch als unbekannt und wurden daher als EST R72964 bezeichnet. Das längere Transkript von 6,2kb wird in allen getesteten Geweben außer in peripheren Blutleukozyten exprimiert. Das kleinere alternativ gespleißte

Transkript von 2,2kb ist ausschließlich im Testikulargewebe nachweisbar (Debeer et al., 2000). Gewebe der weiblichen Brustdrüse wurde nicht untersucht.

1.3.2 Housekeeping-Gene zur Sicherstellung der Qualität von präparierter RNA

Die verwendeten Serumproben enthalten zu geringe RNA-Mengen für eine Qualitätskontrolle durch ein PAA-Gel oder eine photometrische Bestimmung des Absorptionsspektrums. Um das Vorhandensein detektierbarer RNA nach der Präparation sicherzustellen ist somit ein *housekeeping*-Gen als interner Standard erforderlich. Dafür wird ein Gen gewählt, das eine Funktion bei der Basisregulation des zellulären Stoffwechsels übernimmt und somit in jeder kernhaltigen Zelle vorhanden ist. Im Falle dieser Arbeit wurde als interner Marker die mRNA von GAPDH verwendet, einem Schlüsselenzym der Glykolyse. GAPDH-mRNA wird ubiquitär exprimiert und ist auch extrazellulär im Serum detektierbar.

Bei Experimenten mit Primärzellen ist es möglich, die Expression der Zielgene auf *housekeeping*-Gene zu normalisieren, da diese konstitutiv exprimierten Gene eher mit der Zellzahl korrelieren als Regulierte. Durch diese Normalisierung werden Variationen zwischen verschiedenen Proben, beispielsweise durch Pipettierungenauigkeiten, ausgeglichen. Durch neoplastisches Wachstum in transformierten Zelllinien kann jedoch auch die Expression von *housekeeping*-Genen variieren, so dass eine Normalisierung auf diese nicht mehr zuverlässig ist (Goidin et al., 2001). In Gewebeproben verändert sich die GAPDH-Transkription deutlicher als bei Zellkulturen. Dabei sind nicht nur Unterschiede in der GAPDH-Expression zwischen verschiedenen Individuen feststellbar, sondern auch wenn Proben von einem einzigen Menschen zu verschiedenen Zeitpunkten genommen werden.

Stimuliert wird die GAPDH-Transkription unter anderem durch Insulin (Rolland et al., 1995; Barroso et al., 1999), Östrogen (Revillion et al., 2000), Vitamin D (Desprez et al., 1992) oder Hypoxie (Graven et al., 1994; Zhong und Simons, 1999). Eine Herunterregulation der GAPDH-Transkription erfolgt beispielsweise durch Fasten (Yamada et al., 1997) und durch Retinsäure (Barroso et al., 1999).

Beim Mammakarzinom besteht im Tumorgewebe eine negative Korrelation zwischen der GAPDH-Expression und einem Alter von über 40 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnose sowie dem Vorhandensein von Östrogen- und Progesteronrezeptoren. Eine positive Korrelation wurde zwischen der GAPDH-Expression und dem histologischem Grading gefunden. Die Autoren schließen auf eine Assoziation von der GAPDH-Expression und

der Zellproliferation bei Brustkrebs sowie der Aggressivität des Tumors (n=404, Revillion et al., 2000).

Durch diese vielfältigen Ursachen für Variationen in der GAPDH-Transkription erscheint es nicht sinnvoll, detektierte RNA-Spezies auf GAPDH zu normieren. Daher werden in dieser Arbeit sowohl bei Detektionen aus zellulärer RNA als auch bei der Quantifizierung von extrazellulären Nukleinsäuren aus Serum vorzugsweise die Absolutwerte der Messungen abgebildet und keine Normierungen vorgenommen. Der interne Marker wird zur Überprüfung der Qualität der präparierten RNA verwendet und sichert somit das Vorhandensein von intakter RNA, falls die übrigen Marker aus biologischen Gründen nicht detektiert werden können.

1.3.3 Bedeutung von Zellkulturen

Mit der Entwicklung der Zellkulturtechnik Anfang des 19. Jahrhunderts (Carrell, 1912) wurde eine wichtige Grundlage für die Aufklärung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen geschaffen. Auch in der Krebsforschung spielen Zellkulturen eine große Rolle.

Zellkulturen stellen ein artifizielles System dar. Während die Versorgung mit Nährstoffen im lebenden Organismus durch Blutgefäße gewährleistet wird, geschieht dieses in Kulturen durch das Nährmedium. Limitierender Faktor ist für *in vitro*-Zellen die Sauerstoffversorgung, während Nährstoffe ausreichend vorhanden sind. Ist die Zelldichte zu hoch, akkumulieren toxische Stoffwechselprodukte wie Ammonium und Laktat. Das Wachstum in Kultur erfolgt nicht im Gewebeverband wie im Organismus, sondern als isoliertes Zellwachstum. Dadurch verändert sich auch die Morphologie: Der überwiegende Teil wächst in Kultur epitheloid oder fibroblastoid.

Primärkulturen haben eine begrenzte Lebensdauer. Transformierte Zellen hingegen sind zeitlich unbegrenzt passagierbar. Bei Primärzellen ist die Generationszeit länger (etwa 36-48h), im Wachstum fällt eine Kontakthemmung auf: beim Erreichen eines konfluenten Zellrasens wird die Vermehrung blockiert. Im Unterschied dazu haben transformierte Zelllinien eine kurze Verdopplungsrate von durchschnittlich 2-24h. Sie bilden übereinander liegende Zellaggregate aus, sobald die Konfluenz erreicht ist, da keine Hemmung der Zellteilung erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellkultursystem zur Etablierung der molekularbiologischen Methoden verwendet. Außerdem konnten damit Erkenntnisse über die Expression bestimmter RNA-Spezies in verschiedenen humanen Tumorzelllinien

gewonnen werden, um diese anschließend gezielt bei Tumorpatientinnen im Serum zu detektieren. Bei den Resultaten der Zellkulturversuche muss bedacht werden, dass nur isolierte Tumorzellen untersucht werden, während der Einfluss der vielfältigen Wechselwirkungen im Organismus dabei vernachlässigt wird. Zudem können sich Zellen durch die Adaptation an die Kulturbedingungen auch in ihren biochemischen Eigenschaften anpassen und dadurch eine veränderte RNA-Expression aufweisen. Daher wird in dieser Arbeit auch der Frage nachgegangen, inwiefern sich die Zellkulturergebnisse *in vivo* reproduzieren lassen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, eine Methode zur Quantifizierung von extrazellulären RNA-Spezies im Serum zu entwickeln. Damit soll überprüft werden, ob die Expression bestimmter RNA-Spezies in Zellkulturen und im Tumorgewebe Rückschlüsse auf das Vorhandensein und die quantitative Zusammensetzung dieser Spezies im Serum zulässt.

Es soll eine Detektion der mRNA von Hoj-1, GAPDH, Rad51 und Ki-67 in verschiedenen Zelllinien und in Serumproben erfolgen. Bei Rad51 als etablierter Marker im Tumorgewebe soll überprüft werden, ob die publizierte positive Korrelation zwischen der Expression im Tumorgewebe und histologischem Grading sowie die negative Korrelation mit dem Östrogenrezeptorstatus auch durch die im Serum extrazellulär vorliegende RNA bestätigt werden kann. Ki-67-mRNA wurde extrazellulär im Urin nachgewiesen und korreliert dort mit dem Grading bei Harnblasenkarzinomen. Es soll herausgefunden werden, ob dieser Zusammenhang im Serum von Brustkrebspatientinnen ebenfalls besteht. Der bisher nicht etablierte Marker Hoj-1 wird zunächst auf das Vorhandensein in verschiedenen Zellkulturen überprüft. Bei einer potentiellen Eignung als Tumormarker wird anschließend untersucht, ob die mRNA im Serum mit dem Vorhandensein eines Mammakarzinoms korreliert und dadurch Rückschlüsse auf das Grading oder die Prognose möglich sind. Damit soll gleichzeitig nachgeprüft werden, ob ein Array mit gepoolten Proben eine geeignete Methode darstellt, um neue Tumormarker zu beschreiben.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenproben

In der vorliegenden Arbeit wurden Serumproben von Patientinnen mit einem Mammakarzinom sowie von gesunden Frauen auf den Gehalt bestimmter RNA-Spezies untersucht. Verwendet wurden ausschließlich Blutproben von Patientinnen, die über die Studie aufgeklärt waren und sich schriftlich mit der Verwendung des Serums einverstanden erklärten. Die Ethikkommission befürwortete das Projekt (siehe 7.1).

Einschlusskriterien für die Patientengruppe waren folgende: weibliches Geschlecht, vollendetes 18. Lebensjahr, duktal-invasives Mammakarzinom (stanzbioptisch gesichert), Stanzbiopsie nicht länger als sieben Tage zurückliegend sowie die geplante Aufnahme zur operativen Therapie. Als Ausschlusskriterien zählten die mangelnde Einwilligungsfähigkeit, sowie eine zusätzliche maligne Erkrankung in der Anamnese.

Die Probengewinnung erfolgte im Rahmen einer routinemäßigen Blutentnahme mit einer Serummonovette von Sahrstedt, die ein Volumen von neun ml fasst. Die Monovette wurde bei Raumtemperatur 10 Minuten mit 1100 rpm zentrifugiert, anschließend konnte das Serum als Überstand abgehoben und in ein Falconröhrchen überführt werden. Es folgte ein Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Acrylamid	AppliChem
Agar	Sigma
Agarose	Cambrex
APS	Merck
Casein	Gibco
Chloroform	Merck
dNTPs	Peqlab
Ethanol	Roth
EDTA	Merck
Ethidiumbromid	Gibco
Formamid	Merck
Guanidiniumthiocyanat	Gerbu
Hefeextrakt	Gibco
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1	Sigma
Isopropanol	Sigma
Kaliumacetat	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Litiumchlorid	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
N-Laurylsarcosin	Serva
Phenol	Roth
Poly-Inosin	Sigma
Random Hexamer Primer	Invitrogen
RNaseOUT	Invitrogen
SDS	Roth
Spezifische Primer	Metabion
Stains-all	Sigma
TEMED	Roth

Triton-X		Serva
Urea		Gerbu
2.2.2 Puffer		
DNA-Ladepuffer	70% Glycerin	Merck
	50mM EDTA	Merck
	0,5% Bromphenolblau	Sigma
	0,5% Xylencyanolblau	Sigma
N2-Puffer (pH 6,3)	100mM Tris/H ₃ PO ₄	Sigma
	15% Ethanol	Roth
	900mM KCl	Merck
	0,15% Triton X-100	Serva
N3-Puffer (pH 6,3)	100mM Tris/H ₃ PO ₄	Sigma
	15% Ethanol	Roth
	1150mM KCl,	Merck
N5-Puffer (pH 8,5)	100mM Tris/H ₃ PO ₄	Sigma
	15% Ethanol	Roth
	1000mM KCl	Merck
PBS (pH 7,4)	40g NaCl	Merck
	1g KCl	Roth
	7,2g Na ₂ HPO ₄	Merck
	1g KH ₂ PO ₄	Merck
	ad Wasser auf 5l	
S1-Puffer (pH 8,0)	50mM Tris/HCl	Sigma
	10mM EDTA	Serva
	100µg RNase A/ml	Sigma
S2-Puffer	200mM NaOH	Merck
	1% SDS	Roth
S3-Puffer (pH 5,1)	2,8M Kaliumacetat	Sigma
RNA-Probenpuffer	2,3M Urea	Gerbu
	1x TBE	
	66% Formamid	Merck
	0,05% Bromphenolblau	Sigma
	0,05% Xylencyanolblau	Sigma

50x TAE	242g Tris	Sigma
	57,1ml Essigsäure	Merck
	20ml 0,5M EDTA	Serva
	ad Wasser auf 1000ml	
10x TBE (pH 8,3)	445mM Tris	Sigma
	445mM Borsäure	Sigma
	10mM EDTA	Serva
1x TE	10mM Tris	Sigma
	1mM EDTA	Serva
TELT-Puffer	50mM Tris pH 8,0	Sigma
	62,5mM EDTA	Serva
	2,5M LiCl	Sigma
	4% Triton X-100	Serva
	ad Wasser auf 100ml	
Tris		Sigma

2.2.3 Enzyme

DNase I		Qiagen
RNase I		Ambion
RNase A		Sigma
Superscript II Reverse Transkriptase		Invitrogen
Taq Polymerase		New England Biolabs
Trypsin		Linaris
Restriktionsenzym EcoRI		Pharmacia
Restriktionsenzym <i>Spe</i> I		Gibco

2.2.4 Medien und Wachstumsfaktoren

Bovines Insulin		Gibco
DMEM/F12 Medium		Gibco
Fetales Kälberserum (FKS)		Gibco
LB-Medium (pH7,5)	5g Casein	Gibco
	2,5g Hefeextrakt	Gibco
	5g NaCl	Merck
	ad Wasser auf 500ml	

McCoy's 5a Medium		PromoCell
Medium 199		Gibco
Natriumpyruvat		PAA
nicht essentielle Aminosäuren		Gibco
RPMI 1640 Medium		Gibco
SOC Medium	2% Trypton	
	0,5% Hefe-Extrakt	Gibco
	10mM NaCl	Merck
	2,5mM KCl	Roth
	10mM MgCl ₂	Sigma
	10mM MgSO ₄	Sigma
	20mM Glukose	Merck

2.2.5 Kits

DNA-free Kit	Ambion
GAPDH Control Kit	Eurogentec
Nucleobond [®] AX	Macherey-Nagel
QIAamp [®] RNA Blood Mini Kit	Qiagen
qPCR Core Kit for SYBR [®] Green I	Eurogentec
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy [®] MIDI-Kit	Qiagen
Superscript II-Reverse Transkriptase-Set	Invitrogen
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen
Wizard [®] Plus SV Gel and PCR Cleaning System	Promega

2.2.6 Sonstiges

Ampicillin	Boehringer Mannheim
Penicillin / Streptomycin	Gibco
S-Monovette [®]	Sarstedt

2.3 **Geräte**

Acrylamidgel-Kammer	Biometra
Netzgerät	Pharmacia Biotech
Agarosegel-Kammer und Netzgerät	Bio-Rad

Geldokumentationsanlage	Phase
Heizblöcke	IKA
High-Speed Zentrifuge AVANTI	Beckman J-25
Lyophilisator	Savant
Mikrowelle	Bosch
PCR-Cycler	Biotron
Photometer DU [®] 640	Beckman
Pipetten	Eppendorf
Quantitative PCR Gene Amp [®] 5700	Applied Biosystems
Steril-Werkbänke	Heraeus
Thermomixer	Eppendorf
Thermoshake	Gerhardt
Tischzentrifuge	Beckman
Vortexer	IKA
Waage	Sartorius
Wasserbad	Medingen
low speed-Zentrifuge	Hettich

2.4 Methoden

2.4.1 Gelelektrophorese

2.4.1.1 Polyacrylamidgele

Acrylamid ist ein Monomer, das bei Anwesenheit von freien Radikalen zu langen Ketten polymerisiert. Die Porengröße des Gels ist abhängig von der Acrylamid-Konzentration. Polyacrylamidgele eignen sich besonders für die Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten bis 1000bp.

Üblicherweise werden zwei Arten von PAA-Gelen unterschieden: Nicht denaturierende Gele für die Trennung und Reinigung von doppelsträngiger DNA und denaturierende Gele für einzelsträngige Nukleinsäuren. Eine Denaturierung wird durch die Zugabe von Urea erreicht, das Basenpaarungen und damit eine Hybridisierung der Einzelstränge verhindert.

100 ml Gellösung für ein 16%iges denaturierendes Polyacrylamidgel:

- 48g Urea (8M) in 40 ml Acrylamid (bei 40%iger Stock-Lösung) und 10ml 10xTBE lösen
- mit destilliertem Wasser auf 100ml auffüllen

Ein großes Gel benötigt etwa 15 ml Gellösung. Zur Gellösung wurden 200µl APS, das Radikale freisetzt, gegeben. 40µl TEMED stabilisierten die Radikale und starteten damit die Polymerisation. Als Laufpuffer wurde TBE verwendet, der sich durch eine große Pufferkapazität auszeichnet und dadurch höhere Spannungen ermöglicht.

Den Nukleinsäureproben wurde ein Probenpuffer (eine 1:1-Mischung aus Formamid und 8M Urea) zugefügt, in freie Taschen zu beiden Seiten der aufgetragenen Nukleinsäuren wurde zusätzlich ein RNA-Probenpuffer mit den Farbstoffen Bromphenol und Xylencyanol gefüllt. Dieser verhinderte zum einen das Zerlaufen der Proben zum Rand des Gels aufgrund von unterschiedlichen Salzkonzentrationen und diente zum anderen während der Elektrophorese als Orientierung über die Laufstrecke der Nukleinsäuren.

Die Färbung der PAA-Gele erfolgte in stains-all-Lösung.

Stains-all-Lösung:

- 10ml stock stain (enthält 10mg stains-all und 10ml Formamid)
- 10ml Formamid
- 50ml Isopropanol
- 1ml 3M Tris-HCl (pH 8,8)
- 129ml Wasser

2.4.1.2 Agarosegele

Agarose ist ein lineares Polymer mit einem Disaccharid aus D-Galaktose und 3,6-anhydro-L-Galaktose als Grundstruktur. Im elektrischen Feld wandert Doppelstrang-DNA mit einer von der Basenzahl abhängigen Geschwindigkeit zur Anode.

Zur qualitativen DNA-Analyse wurden 2%ige Gele angefertigt, zur Dokumentation einer Restriktionsverdauung 1%ige. Dazu wurde die entsprechende Agarosemenge je nach Gelgröße in 1xTAE-Puffer gegeben und bis zum vollständigen Lösen in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,8µg/ml) dazu gegeben: Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und macht diese unter UV-Licht sichtbar.

Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (mit Xylencyanol) versetzt. Als Größenmarker diente eine 100bp-DNA-Leiter, der DNA-Ladepuffer (mit Xylencyanol und Bromphenol) zugefügt wurde.

Die Gelläufe im Laufpuffer 1xTAE wurden bei 90V für 30 Minuten durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit einer CCD-Kamera nach Anregung durch UV-Licht.

2.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei der Photometrie wird monochromatisches Licht durch eine Küvette definierter Dicke gelenkt und dabei die Absorption des Lichtes anhand der durchgelassenen Strahlungsenergie gemessen.

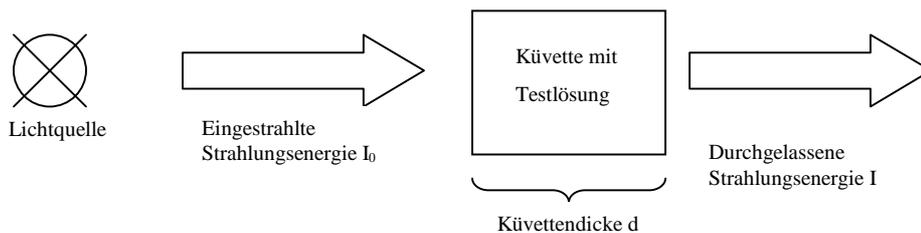


Abbildung 2: Schema der photometrischen Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Testlösung beruht dabei auf folgenden Grundlagen:

Die Intensität I nimmt logarithmisch mit der Küvette Dicke d und dem Extinktionsmodul k ab ($I = I_0 \cdot e^{-k \cdot d}$, Lambertsches Gesetz). Das Extinktionsmodul k entspricht dem Produkt aus der Konzentration c der Lösung in der Küvette und dem stoffabhängigen Extinktionskoeffizienten ϵ ($k = \epsilon \cdot c$, Beersches Gesetz). Daraus ergibt sich das Lambert-Beersche Gesetz: $\lg I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot d$. Vereinfacht wird das Gesetz durch den Zusammenhang

Extinktion $E = \lg I_0/I$, so dass es sich auch durch $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ ausdrücken lässt. Die Konzentration einer Lösung entspricht folglich $c = E / \varepsilon \cdot d$.

Die Nukleinsäurebestimmung erfolgte über die Messung der Extinktion bei 260nm. Um die optische Dichte der Nukleinsäurelösung zu messen, wurde zuvor als Nullwert die Extinktion des Verdünnungsmediums (destilliertes Wasser oder 10mM Tris, pH8) bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration der Nukleinsäurelösung wurde die gemessene optische Dichte multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor der Lösung sowie einem Multiplikationsfaktor, der für doppelsträngige DNA 50, für RNA 40 und für einzelsträngige Oligonukleotide 20 beträgt.

Proteine absorbieren monochromatisches Licht bei 280nm. Daher lässt sich durch das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} der Reinheitsgrad einer Nukleinsäurelösung abschätzen.

2.4.3 RNase-Kontaminationstest

Um zu überprüfen, ob Lösungen mit RNase kontaminiert sind, wurde ein MS2-Test durchgeführt. Dazu wurde MS2-RNA (definierte RNA des Phagen MS2 mit einem Molekulargewicht >2kb) zur Testlösung pipettiert. Sofort nach RNA-Zugabe wurde ein Aliquot entnommen, in ein Eppendorfgefäß mit vorgelegtem RNA-Probenpuffer überführt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die übrige Testlösung mit zugegebener MS2-RNA wurde bei 37°C inkubiert. Zu drei weiteren Zeitpunkten wurde jeweils ein weiteres Aliquot davon entnommen und damit ebenso verfahren wie mit dem ersten.

Protokoll für den DNase-Kontaminationstest

- In vier Eppendorfgefäßen jeweils 5µl RNA-Probenpuffer vorlegen
- In einem weiteren Eppendorfgefäß 4µl Testlösung mit 10µl Wasser versetzen
- Reaktion starten durch Zugabe von 2µl MS2-Lösung zur verdünnten Testlösung, durch pipettieren mixen
- Sofort ein Aliquot von 4µl entnehmen, in Eppendorfgefäß mit 5µl Probenpuffer überführen, mixen und in flüssigem Stickstoff lagern
- weitere Aliquots von 4µl nach 5, 15 und 40 Minuten entnehmen

Anschließend erfolgte die Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel (siehe 2.4.1.1): Falls die Testlösung mit RNase kontaminiert wäre, würde eine Degradierung der Phagen-RNA in Form niedermolekularer Banden erkennbar sein.

2.4.4 Zellkultur

Die Zellkultur-Arbeiten mit verschiedenen humanen Zelllinien wurden unter einer Steril-Werkbank ausgeführt. Ein Medienwechsel erfolgte alle 2 Tage, gesplittet und umgesetzt

wurden die Zellen abhängig von ihrer Verdopplungszeit. Dazu wurden die Adhäsionszellen durch eine maximal fünfminütige Inkubation bei 37°C mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst, pelletiert und in vorgewärmtem frischem Medium resuspendiert. Suspensionszellen wurden gründlich mit einer Pipette durchmischt, ein Teil der Zellsuspension verworfen oder in eine neue Flasche überführt und das entnommene Volumen mit frischem Medium aufgefüllt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

2.4.4.1 MDA-MB-231

MDA-MB-231 ist eine adhärente Mammakarzinom-Zelllinie (Adenokarzinom), die keine Östrogen- oder Progesteronrezeptoren exprimiert. Als Medium wurde 90% DMEM/F12 (+100U/100ml Penicillin und Streptomycin) mit 10% FKS benutzt.

2.4.4.2 MCF-7

Es handelt sich bei MCF-7 um eine Adhäsionszelllinie, die 1970 aus einem metastasierten Adenokarzinom der Mamma gewonnen wurde. Die Zellen enthalten Östrogenrezeptoren und haben eine Verdopplungszeit von ca. 50 Stunden. Als Medium wurde verwendet: RPMI 1640 mit 10% FKS, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1mM Natriumpyruvat und 10 µg/ml bovines Insulin.

2.4.4.3 HELA

Die Adhäsionszelllinie HELA wurde 1951 aus einem Cervixkarzinom etabliert, dabei handelte es sich um ein Adenokarzinom. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 48 Stunden. Das geeignete Medium besteht aus 90% DMEM/F12 und 10% FKS.

2.4.4.4 HEC-1A

Die Adhäsionszelllinie leitet sich von einem Endometriumkarzinom des Uterus ab. Bei diesem Adenokarzinom sind keine Hormonrezeptoren nachweisbar. Als Medium wurde für diese Zelllinie 90% McCoy's 5a mit 10% FKS gebraucht.

2.4.4.5 LNCAP

LNCAP ist eine Prostatakarzinom-Zelllinie, die aus einer Lymphknotenmetastase etabliert wurde. Die Verdopplungszeit dieser fibroblastoiden Zellen beträgt 60 Stunden, Medium für diese Adhäsions-Zelllinie ist 90% RPMI 1640 mit 10% FKS.

2.4.4.6 ECV-304

Es handelt sich bei dieser Adhäsionszelllinie um ein Urothelkarzinom der Harnblase. ECV-Zellen sind bekannt für ihr hohes Proliferationspotenzial und verdoppeln sich in etwa 2 Tagen. Als Medium wurde 90% Medium 199 und 10% FKS verwendet.

2.4.4.7 HEP-G2

Hierbei handelt es sich um eine Adhäsionszelllinie, die aus dem Tumorzellgewebe eines Mannes mit hepatozellulärem Karzinom stammt. Als Medium bewährte sich bei dieser Zelllinie 89% DMEM/F12 mit 10% FKS und 1% nicht essentiellen Aminosäuren, die Verdopplungszeit beträgt 50-60 Stunden.

2.4.4.8 JURKAT

JURKAT ist eine Suspensionszelllinie. Ursprünglich wurde sie aus dem peripheren Blut eines männlichen Patienten mit T-Zell-Leukämie (akute lymphatische Leukämie) gewonnen. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 30 Stunden. Dem verwendete Medium RPMI 1640 wurden 10% FKS, 1% nicht essentielle Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat zugesetzt.

2.4.4.9 BJAB

BJAB ist ebenfalls eine Suspensionszelllinie. Sie wurde aus dem peripheren Blut einer weiblichen Patientin mit Burkitt-Lymphom etabliert und verdoppelt sich in etwa 30 Stunden. Das verwendete Medium war RPMI 1640 mit 10% FKS und 1% nicht essentiellen Aminosäuren.

2.4.4.10 Fibroblasten

Die Fibroblasten-Primärzellen wurden aus der Hautprobe eines Mannes, der weder an einem Karzinom erkrankt ist noch unter Diabetes mellitus oder Adipositas leidet, etabliert. Sie wachsen adhärent und benötigen folgendes Medium: 80% RPMI 1640 mit 20% FKS. Dem Medium wurden 100U/100ml Penicillin und Streptomycin zugesetzt. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 72 Stunden.

2.4.5 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von zellulärer RNA erfolgte mit dem RNeasy[®] MIDI-Kit von Qiagen. Bei diesem Kit werden Spin-Säulen mit Silika-Membranen verwendet, an denen RNA-Moleküle ab einer Länge von ca. 200 Basenpaaren adsorbieren.

Die adhärenen Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen, trypsiniert, resuspendiert und gezählt, danach wurden etwa 10^7 Zellen pelletiert und mit dem Lysispuffer RLT versetzt. Dieser enthält Guanidiniumthiocyanat und wirkt denaturierend, so dass auch RNasen inaktiviert werden. Nach einer Homogenisierung durch gründliches Mischen wurde Ethanol zugefügt, um die Bindungsbedingungen der RNA an die Membran der Säule zu optimieren.

Anschließend konnte die Probe auf die Säule gegeben werden, beim Zentrifugieren adsorbiert die RNA. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Säule wurde einmal mit dem Waschpuffer RW1 (der ebenfalls Guanidiniumthiocyanat enthält, die genauen Zusammensetzungen der Puffer werden vom Hersteller nicht angegeben) gewaschen. Danach erfolgt auf der Säule eine DNA-Verdauung mit DNase I aus dem RNase-Free DNase Set von Qiagen. Zur Inaktivierung der DNase wurde ein weiterer Inkubations- und Waschschrift mit RW1-Puffer angeschlossen. Im Anschluss wurde die Säule zweimal mit RPE-Puffer gewaschen, der vier Volumen Ethanol enthält. Dann erfolgte die Elution mit dreimal 100µl RNase-freiem Wasser.

Protokoll der RNA-Isolierung mit dem RNeasy® MIDI-Kit:

- Zellen waschen, pelletieren, mit Medium resuspendieren, zählen (Kapazität einer MIDI-Säule: 5×10^6 - 3×10^7 Zellen)
- 10^7 Zellen pelletieren und mit 2ml RLT-Lysispuffer resuspendieren → gründlich vortexen
- 2ml 70%Ethanol dazugeben → vortexen, auf die Säule geben, zentrifugieren: 7min 4000xg
- 2ml RW1-Puffer auf die Säule geben → 5min 4000xg
- 20µl DNase I Lösung mit 140µl Puffer RDD mischen und auf die Säule pipettieren → 15min bei Raumtemperatur inkubieren
- 2ml RW1-Puffer auf die Säule geben → 5min inkubieren, dann 5min 4000xg
- 2,5ml RPE-Puffer auf die Säule → 2min 4000xg
- 2,5ml RPE auf die Säule geben → 5min 4000xg
- Säule auf ein neues Falconröhrchen stellen, 100µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silica-Membran pipettieren → 1min bei Raumtemperatur inkubieren, zur Elution 5min 4000xg
- Elution mit 2x100µl Wasser wiederholen

Das Eluat wurde im Lyophilisator eingengt und auf ein Volumen von 100µl gebracht. Anschließend erfolgte im Photometer die Konzentrationsbestimmung und Beurteilung der Reinheit anhand des Spektrums der Extinktionen von 200nm bis 300nm sowie der Ratio 260nm/280nm. Im Falle einer Verunreinigung des Spektrums durch Salze erfolgte eine Aufreinigung der isolierten RNA mit einer Mikrospin™G-25 Säule der Firma Amersham Biosciences.

Protokoll für die RNA-Aufreinigung mit Mikrospin™G-25 Säulen

- Säule vortexen, dann den Deckel lüften und den Verschluss der Säulenunterseite entfernen -> zentrifugieren: 2min 735xg, Eluat verwerfen
- 100µl RNA-Lösung auf die Säule geben → 2min bei 735xg zentrifugieren
- eluierte gereinigte RNA-Lösung in ein sauberes Eppendorfgefäß überführen

Mit der gereinigten RNA-Lösung erfolgte eine erneute Konzentrationsbestimmung im Photometer, außerdem wurde die Qualität der isolierten RNA mit einem Polyacrylamid-Gel untersucht.

2.4.6 RNA-Isolierung aus Leukozyten

Zur Isolierung von RNA aus kernhaltigen Blutzellen wurde das QIAamp® RNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen verwendet, das die Präparation von RNA aus bis zu 1,5 ml frischem Vollblut erlaubt. Das Blut gesunder Erwachsener enthält als Referenzwert 3800-10500 Leukozyten pro µl.

In diesem Protokoll werden ebenso wie bei dem RNeasy® MIDI Kit (siehe 2.2.5) Säulen mit Silika-Membranen verwendet. Auch einzelne Puffer des QIAamp® RNA Blood Mini Kit entsprechen denen des RNeasy® MIDI Kits.

Zur Isolierung wurde zunächst venöses Blut in einer EDTA-Monovette entnommen und jeweils 1,5 ml Blut mit Erythrozyten-Lysispuffer versetzt. Erythrozyten enthalten keine Nukleinsäuren und sind zudem in deutlich größerer Anzahl (etwa Faktor 1000) als Leukozyten im Blut enthalten, so dass die RNA-Isolierung ohne Erythrozyten vereinfacht wird. Der Erythrozyten-Lysispuffer ist hypoton, da Erythrozyten im Gegensatz zu Leukozyten in diesem Milieu lysieren.

Nach der Erythrozytenlyse wurde die Lösung zentrifugiert, so dass ein Pellet aus Leukozyten entstand. Nach einem weiteren Durchmischen mit Erythrozyten-Lysispuffer und erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in RLT-Lysispuffer resuspendiert und auf eine Spin-Säule geladen. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde dann das Lysat aufgehoben und mit Ethanol gemischt, während die Säule verworfen wurde. Das Ethanol/Leukozyten-RNA-Gemisch wurde auf eine neue Säule gegeben und nach drei Waschschritten mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Protokoll des Qiamp RNA Blood Mini Kits:

- 1,5ml Vollblut mit 7,5ml Puffer EL (Erythrozyten-Lysispuffer) versetzen → gründlich vortexen
- 15min auf Eis inkubieren, während der Inkubation noch 2x vortexen
- 10min bei 400xg und 4°C pelletieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 3ml EL-Puffer resuspendieren, gut vortexen → pelletieren: 10min, 400xg, 4°C
- Überstand gut absaugen
- 600µl RPE-Puffer mit 6µl β-Mercaptoethanol versetzen und darin das Zellpellet resuspendieren → Säule mit Zelllysate beladen, 2min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- Säule verwerfen, das Lysat aufheben und mit 600µl 70% Ethanol mischen
- Die Hälfte der Mischung auf eine neue Säule geben (Maximalvolumen der Säule beträgt 700µl), 15 Sekunden mit >10000rpm zentrifugieren
- die Säule mit der anderen Hälfte der Ethanol-Zelllysate-Mischung beladen und ebenso zentrifugieren
- Waschen der Säule mit 700µl RW1-Puffer → 15 sec 10000rpm
- 500µl RPE-Puffer auf die Säule pipettieren → 15 sec >10000 rpm
- erneut 500µl RPE-Puffer auf die Säule geben → 3min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
- Elution: 50µl RNase-freies Wasser auf die Säule geben → 1min Inkubation, danach 1min >10000rpm
- Elution mit 30µl Wasser wiederholen

Nach der Elution wurden die Proben mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 100µl gebracht und mit Microspin™G-25 Säulen (siehe 2.4.5) aufgereinigt. Die anschließende Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

Da auf der Säule keine DNase-Verdauung durchgeführt wurde, erfolgte diese nach der Konzentrationsbestimmung mit dem DNA-free™ Kit der Firma Ambion. Bei diesem System wird die DNase durch einen Inaktivator entfernt, so dass weder eine Erhitzung oder EDTA-Zugabe noch eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Enzymentfernung nötig sind. Das DNase-Inaktivierungs-Reagenz besteht aus einer fest-flüssigen Suspension, die vor Gebrauch zunächst durch vortexen aufgeschwemmt werden muss.

Protokoll zur DNase-Verdauung mit dem DNA-free™ Kit (Ambion):

- 10µg DNA-kontaminierte RNA-Lösung mit Wasser auf 44µl bringen
- 5µl 10xPuffer und 1µl DNase I (2U) zufügen → Inkubation: 30min bei 37°C
- Zur Entfernung der DNase das Inaktivierungsreagenz gründlich vortexen und 5µl (=0,1 Volumen) zum Verdauungsansatz zufügen → Inkubation bei Raumtemperatur für 2min
- Inaktivierungsreagenz durch Zentrifugation pelletieren: 2min bei 10000xg
- Den Überstand, der die RNA enthält, in ein neues Eppendorfgefäß überführen

2.4.7 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus der isolierten total-RNA erfolgte mit dem Superscript II-Reverse Transkriptase-Set von Invitrogen. Dabei wird einzelsträngige RNA durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben. Das Enzym stammt ursprünglich aus dem Moloney murine leukemia virus und wurde so weit modifiziert, dass es keine RNase H-Aktivität besitzt.

Im verwendeten Protokoll wurden randomisierte Hexamer-Primer (random hexamers) genutzt. Bei zellulärer RNA wurden 1,2µg pro Ansatz einer Reversen Transkription eingesetzt, bei extrazellulärer RNA die Hälfte des Eluates einer RNeasy-Säule (entspricht RNA aus 500µl Serum). Bei extrazellulärer RNA erfolgte zusätzlich eine Zugabe des RNase-Inhibitors RNaseOUT.

Das RNA-Primer-Gemisch wurde erst bei 94°C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuspalten, dann bei 52°C. Im Anschluss wurden dNTPs, 5x-Puffer und DTT zugegeben und auf 42°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur erfolgte die Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase. Nach einem Inkubationsschritt bei 25°C zum Hybridisieren der Hexamer Primer folgte die Reverse Transkription bei 42°C. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C inaktiviert.

Protokoll der Reversen Transkription

RNA-Probe mit 1µl random Primer (c=100ng/µl) und Wasser (bei extrazellulärer RNA zusätzlich 1µl RNaseOUT) auf 12µl bringen

- 4min 92°C
- 10min 52°C

Zugabe von 1µl dNTP, 4µl 5x-RT-Puffer und 2µl DTT

- 2min 42°C

Zugabe von 1µl Superscript-II Reverse Transkriptase

- 10min 25°C
- 50min 42°C
- 15min 70°C

Zusätzlich wurde zu jeder RNA-Probe eine non-RT-Kontrolle mitgeführt, bei der alle Schritte gleich durchgeführt wurden außer der Enzymzugabe: Hier wurde statt des Enzyms Wasser verwendet.

2.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Bestimmt wird diese Sequenz durch zwei spezifische Oligonukleotide, die jeweils an einem Strang komplementär binden. Die verwendeten Oligonukleotide von Hoj-1 und Ki.67 wurden mit dem Programm Primer Express, Version 2.0 (Applied Biosystems) entworfen.

Verwendete Oligonukleotide (=Primer):

1) Hoj-1

Forward Primer Hoj-fwd: 5'-GTG CTG TCC TTC CTC AAG ACT ACC T-3'

Reverse Primer Hoj-rev: 5'-GCA GGA ACA CGG AGT GGA GAA-3'

Forward Primer ho2f: 5'-CAT TCT CAC TGG CTC GGA GAC TC-3'

Reverse Primer ho2r: 5'-CAC TCA AGG TCC CTG AGA GTG G-3'

Forward Primer ho3f: 5'-TCT CCA CTC CGT GTT CCT GC-3'

Reverse Primer ho4r: 5'-CGG CCC AGT TCG TCG TAG A-3'

2) GAPDH Primer-Mix aus dem GAPDH Control Kit von Eurogentec, Sequenzen werden nicht angegeben

3) Rad51

Forward Primer: 5'-ATG CGC CAA AGA AGG AGC TA-3'

Reverse Primer: 5'-CTC ACC TCG ACC CGA GTA GTC TG-3'

4) Ki-67

Forward Primer: 5'-CGG ACT TTG GGT GCG ACT T-3'

Reverse Primer: 5'-GTC GAC CCC GCT CCT TTT-3'

Zur Amplifikation wurde der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 94°C denaturiert, anschließend wurde die Temperatur zur Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge auf 60°C gesenkt. Als dritter Schritt erfolgte bei 72°C ausgehend von den Primern eine Zweitstrang-Synthese durch die thermophile Taq-Polymerase. In den folgenden Zyklen dienten jeweils die vorhandenen DNA-Stränge als Matrizen für eine neue Synthese.

Zur Amplifikation von zellulärer cDNA wurde das Produkt der Reversen Transkription aus 120ng total-RNA eingesetzt. Dieses entsprach 1/10 des RT-Ansatzes mit einem Volumen von 2 µl.

Protokoll für die PCR mit der Taq Polymerase von New England BioLabs:

2µl des cDNA-Ansatzes aus der reversen Transkription (entspricht cDNA aus 120ng total-RNA) im Reaktionsgefäß vorlegen und 48µl Mastermix zufügen, der pro Ansatz folgende Komponenten enthält:

- 36,6µl Wasser
- 5 µl 10x-Puffer (enthält als 1x Puffer 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM Tris-HCl, 2mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH 8,8 bei 25°C)
- 1µl dNTP-Mix (10mM)
- 2,5µl Forward Primer (5µM)
- 2,5µl Reverse Primer (5µM)
- 0,4µl Taq Polymerase (5U/µl)

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Protokoll:

- 1) 2 Minuten 94°C (initiale Denaturierung)
- 2) 15 Sekunden 94°C (Denaturierung der Doppelstränge)
- 3) 45 Sekunden 60°C (Annealing der Primer an komplementären Einzelstrang)
- 4) 60 Sekunden 72°C (Elongation der Primer)
- 5) 7 Minuten 72°C (letzte Elongation)
- 6) 4°C (Herunterkühlen)

die Schritte 2-4 wurden 34x wiederholt, so dass in 35 Zyklen amplifiziert wurde.

Um Kontaminationen des cDNA-Ansatzes oder der Reagenzien mit genomischer DNA zu erkennen, wurde zusätzlich zu jedem Ansatz eine non-RT-Kontrolle sowie eine non-template-Kontrolle, die Wasser statt cDNA enthält, mitgeführt.

Die Auswertung der PCR erfolgte mit einem 2%igem Agarosegel (siehe 2.4.1.2), aufgetragen wurden jeweils 10µl eines PCR-Ansatzes. Bei erfolgreicher Amplifikation war eine Bande in der Laufhöhe sichtbar, die im Vergleich zur DNA-Leiter der Basenanzahl der gewünschten DNA-Sequenz entspricht.

2.4.9 Isolierung von RNA aus Serum

Die gefrorenen Serumproben wurden zügig bei 30°C im Wasserbad aufgetaut, anschließend je 1 ml Serum mit 1 ml Lysispuffer versetzt.

Zusammensetzung des Lysispuffers:

- 250g Guanidiniumthiocyanat [5,64M]
- 157 ml Wasser
- 5,35 ml Sarcosyl [35%]
- 18,75 ml NaOAc [1M, pH 6,5]

Nach Zugabe von 2 ml 70%igem Ethanol und gründlichem Vortexen konnten die Proben auf RNeasy[®] MIDI-Säulen geladen und anschließend nach dem QIAGEN-Protokoll (siehe

2.4.5) aufgereinigt werden. Die Eluate wurden anschließend lyophilisiert, auf ein Volumen von 10µl gebracht und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C verwahrt.

2.4.10 Klonierung von Standards für die quantitative PCR

Um eine bestimmte DNA-Sequenz in größerer Menge zur Verwendung als Standard zu erhalten, kann sie in einen Vektor einkloniert werden. Dieser wird in Bakterien transformiert, und die Bakterien in Kultur vermehrt, so dass eine Vervielfältigung stattfindet. Dazu wurde zunächst die ausgewählte Sequenz in einer PCR aus zellulärer Gesamt-cDNA amplifiziert und auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.4.10.1 Gelelution von PCR-Produkten

Die Gelelution der spezifischen Sequenz aus dem Agarosegel erfolgte mit dem „Wizard® Plus SV Gel and PCR Cleaning System“ von der Firma Promega. Dabei handelt es sich um Silikamembran-Säulen, mit denen sich DNA-Fragmente zwischen 100bp und 10kb aus Agarosegelen extrahieren und aufreinigen lassen.

Die Bande der zu klonierenden Sequenz wurde nach der Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und in einer Membran-Bindungs-Lösung aufgelöst. Im Anschluss wurde die Lösung auf die Spin-Säule gegeben, zentrifugiert und mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit Wasser.

Protokoll der Gelelution mit dem „Wizard® Plus SV Gel and PCR Cleaning System“ von Promega:

- Bande aus dem Agarosegel ausschneiden, in ein Eppendorfgefäß geben und wiegen
- Zufügen von 10µl Membran-Binding-Solution (enthält 4,5M Guanidiniumisothiocyanat und 0,5M Kaliumacetat) pro 10mg Gel
- Im Thermomixer 10 Minuten bei 55°C schütteln, um das Gel aufzulösen
- Probe 1min bei 5000rpm zentrifugieren, Überstand auf die Säule laden → 1min bei Raumtemperatur inkubieren, dann 1min bei 16000xg zentrifugieren
- 700µl Membran Wash Solution (enthält 10mM Kaliumacetat, 16,7µM EDTA und 80% Ethanol) auf die Säule geben → 1min bei 16000xg zentrifugieren
- 500µl Membran Wash Solution auf die Säule geben → 5min bei 16000xg zentrifugieren
- Zur Elution 50µl nukleasefreies Wasser auf die Säule geben → 1min bei Raumtemperatur inkubieren, 1min bei 16000xg zentrifugieren

2.4.10.2 Zufügen von Adenin-Überhängen an das PCR-Fragment

Die Transformierung erfolgte mit dem TOPO TA Cloning® Kit von Invitrogen. Dabei wird das PCR-Fragment in den pCR®2.1-TOPO® Plasmid Vektor integriert und anschließend in chemisch kompetente E. coli-Zellen transformiert.

Der Plasmidvektor weist am 3'-Ende einen Thymidin-Überhang auf. Damit die PCR-Fragmente in den Vektor integriert werden konnten, wurde an den 3'-Enden jeweils ein Adenin-Überhang angefügt.

Protokoll zum Anhängen von Adeninresten

- 30µl PCR-Fragment aus der Gelelution
- 4µl 10x PCR-Puffer
- 1µl dATP (10mM)
- 0,5µl Taq Polymerase
- 4,5µl Wasser -> 50min bei 72°C inkubieren

2.4.10.3 Ligation der PCR-Produkte in den pCR2.1-TOPO Klonierungsvektor

Der Plasmidvektor wurde in diesem Kit durch die Topoisomerase I geschnitten und liegt somit linearisiert vor. Das Enzym ist an den linearisierten Vektor gebunden und blockiert die beiden DNA-Enden, um eine Selbstligation zu verhindern. Durch das Einfügen des PCR-Produktes wird die Topoisomerase 1 abgespalten und stellt dabei durch die Aufspaltung eines Phosphodiesters die Energie für die Ligation bereit.

Protokoll für die Ligation:

- 2µl PCR-Produkt mit A-Überhängen
- 2µl Wasser
- 1µl verdünnte Salzlösung
- 1µl pCR2.1-TOPO Klonierungsvektor -> 30min bei Raumtemperatur inkubieren

2.4.10.4 Chemische Transformation

Die Einschleusung der Plasmide in *E. coli*-Bakterien erfolgte durch eine chemische Transformation. Dazu wurde der Ligationsansatz mit chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterien auf Eis inkubiert, bevor die Plasmide durch einen Hitzeschock in die Zellen eingeschleust wurden. Im Anschluss wurde SOC-Medium dazugegeben und bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle in einem zweiten Reaktionsansatz ein bereits präpariertes zirkuläres Plasmid in Bakterien transformiert. Als Negativkontrolle dienten *E. coli*-Bakterien ohne Plasmid.

Protokoll für die chemische Transformation:

- In ein Eppendorfgefäß 50µl chemisch kompetente *E. coli* geben
- 2µl des Ligationsansatzes dazu pipettieren (bzw. 1µl zirkuläres Plasmid als Positivkontrolle) → 30min Inkubation auf Eis
- für den Hitzeschock 45 Sekunden bei 42°C, danach 2min auf Eis stellen
- 500µl SOC-Medium dazugeben → 1h bei 37°C im Thermomixer schütteln

Danach wurden die Bakterien auf vorgewärmten Agarplatten mit Ampicillin als selektives Medium ausplattiert. Der pCR2.1-TOPO Vektor enthält ein Ampicillinresistenzgen, so dass nur Klone, die das Plasmid enthalten, wachsen konnten.

Gießen von Agarplatten (AMP 100 Agar)

- 6g Agar, 5g Casein, 5g NaCl und 2,5g Hefeextrakt mit Wasser auf 500ml bringen
- pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen → Lösung autoklavieren
- Abkühlen lassen auf 50°C, dann 50mg Ampicillin (=100µg/ml) zufügen → Agarlösung in Petrischalen gießen

Die auf Agarplatten ausplattierten *E. coli*-Bakterien wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

2.4.10.5 Selektionierung von Klonen

Nach der Kultivierung auf Agarplatten wurden die Bakterienkolonien begutachtet. Um einzelne Klone zu selektionieren, wurde jeweils eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in ein verschließbares Röhrchen mit 4ml LB-Medium überführt. Das Medium war zuvor mit 400µg Ampicillin (=100µg/ml) als Selektionsantibiotikum beimpft worden. Die Kultivierung der Schüttelkulturen erfolgte über Nacht bei 37°C und 200rpm im Thermoshaker.

2.4.10.6 Plasmid-Mini-Präparation

Von den angewachsenen Schüttelkulturen wurden zunächst Glycerinkulturen angelegt: 500µl Zellsuspension wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 500µl autoklaviertem Glycerin gründlich durchmischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80° gelagert.

Die restlichen *E. coli*-Zellen wurden zur Präparation zunächst pelletiert und in TELT Puffer resuspendiert, der eine Lyse der Zellmembranen bewirkt. Dabei fand gleichzeitig eine RNase-Verdauung statt. Nach Zugabe von Phenol und Chloroform kam es zur Phasentrennung. Die obere wässrige Phase enthielt dabei die DNA, darunter war eine

deutliche Protein-Interphase sichtbar. Die Oberphase wurde abgehoben und mit Ethanol gefällt, das Pellet anschließend in TE-Puffer resuspendiert.

Protokoll der Jeff Lawrence TELT Präparation

- Zellsuspension 10min bei 4000xg und 4°C pelletieren
- Überstand absaugen, Zellpellet in 100µl TELT Puffer + 2µl RNase A resuspendieren
- 100 µl eines Gemisches aus Phenol / Chloroform / Isoamyl Alkohol (25:24:1) zufügen → 15 Sekunden gut vortexen, dann 1min bei Raumtemperatur zentrifugieren
- obere Phase in ein Eppendorfgefäß überführen
- 200µl 95% Ethanol zugeben und gut mischen → 5min bei 15000rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand absaugen, Pellet vorsichtig mit 70% Ethanol überschichten, kurz zentrifugieren
- Überstand absaugen, Pellet trocknen
- Pellet in 20µl TE-Puffer resuspendieren

2.4.10.7 Restriktionsverdauung mit *EcoRI*

Die Restriktionsverdauung beruht auf der Eigenschaft von Restriktionsendonukleasen, eine jeweils enzymespezifische DNA-Sequenz zu erkennen und zu spalten.

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pCR2.1-TOPO enthält zwei Schnittstellen für *EcoRI*, die jeweils zu beiden Seiten des einklonierten PCR-Produktes liegen. Dadurch war es möglich, durch eine *EcoRI*-Verdauung das Plasmid zu schneiden und auf einem Agarosegel (siehe 2.4.1.2) zu überprüfen, ob das gewünschte Insert vorhanden ist und ob die Größe mit der eingefügten DNA-Sequenz übereinstimmt.

Protokoll für die Restriktionsverdauung mit *EcoRI*

- 1µg Plasmid-DNA mit Wasser auf ein Volumen von 8µl bringen
- mit 1µl 10xPuffer und 1µl *EcoRI* versetzen
- mindestens 2h bei 37°C inkubieren
- anschließend 2µl DNA-Probenpuffer zugeben und auf ein 1%iges Agarosegel auftragen
- neben der geschnittenen Probe als Kontrolle 1µg unverdaute Plasmid-DNA auf dem Gel laufen lassen

2.4.10.8 Sequenzierung

Zeigt sich auf dem Kontrollgel nach der Restriktionsverdauung, dass aus dem Plasmid ein Insert der erwarteten Größe herausgeschnitten wurde, muss anschließend die Sequenz überprüft werden. Das kann mittels einer erneuten PCR mit dem Plasmid und den Primern der einklonierten DNA-Sequenz geschehen, alternativ kann es sequenziert werden.

Die Sequenzierung beruht darauf, dass die DNA denaturiert wird, Primer hybridisieren und dann mit einer Polymerase eine Verlängerung erfolgt. Zusätzlich zu den erforderlichen 2'-Desoxynukleotiden wird in jedem von insgesamt vier Reaktionsansätzen eine andere Base als 2',3'-Didesoxynukleotid zugefügt. Wird dieses statt einem dNTP eingebaut, kommt es zum Strangabbruch. Da die Didesoxynukleotide mit den Desoxynukleotiden um die Bindungsstelle konkurrieren, entstehen nach dem Zufallsprinzip verschieden lange DNA-Stränge. Anschließend erfolgt eine Auftrennung der vier Reaktionsansätze auf einem Acrylamidgel. Sind die 2',3'-Didesoxynukleotide radioaktiv markiert, lässt sich anhand der Länge der Fragmente bestimmen, an welchen Positionen jeweils die als verändertes Nukleotid zugegebene Base steht.

Als Primer für die Sequenzierung wurde der M13 Reverse- oder Forward-Primer verwendet. Mit der Sequenz dieser Primer wird im pCR2.1-TOPO Vektor die einklonierte DNA-Sequenz eingeschlossen. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Sequenzierungen von der Firma Sequence Laboratories durchgeführt.

2.4.10.9 Plasmid-Maxi-Präparation mit dem Nucleobond[®] AX-Kit von Macherey-Nagel

Bestätigte auch die Sequenzierung das Vorhandensein der gewünschten DNA-Sequenz, wurde eine größere Plasmidmenge für die Standardherstellung präpariert. Dazu wurde aus der Glycerinkultur des entsprechenden Klons erneut eine Schüttelkultur mit 4ml LB-Medium sowie Ampicillin angelegt und etwa 8h bei 37°C und 200rpm im Thermoshaker kultiviert. Nach der Trübung des Mediums als Zeichen für ein Anwachsen der Kultur wurden damit 200ml vorgewärmtes LB-Medium im Erlenmeyerkolben beimpft und über Nacht ebenfalls im Thermoshaker kultiviert.

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Nucleobond[®] AX-Kit von Macherey-Nagel. Die Isolierung basiert auf einer Anionenaustauscherchromatographie mit Silika-Säulen, der Durchfluss erfolgt durch die Schwerkraft. Nukleinsäuren binden dabei an das positiv geladene Säulenmaterial.

Zunächst wurde die Bakteriensuspension pelletiert. Das Pellet wurde im S1-Puffer, der unter anderem RNase 1 enthält, resuspendiert und anschließend mit dem SDS-haltigen S2-Puffer versetzt. Dadurch erfolgt die Lyse der Bakterien, gleichzeitig denaturiert die DNA durch den alkalischen pH-Wert. Nach der Neutralisation mit S3-Puffer hybridisieren die Stränge der Plasmid-DNA wieder, während die chromosomale DNA durch ihre Größe einzelsträngig bleibt und im Kalium-SDS ausfällt.

Im nächsten Schritt wurden die Kalium-SDS-Flocken abfiltriert, währenddessen erfolgte

die Equilibrierung der Säule mit N2-Puffer. Das Filtrat wurde auf die Säule gegeben und konnte nach drei Waschschritten mit N3-Puffer eluiert werden. Die Elution erfolgte mit Puffer N5. Da die Bindung der Plasmid-DNA an Anionenaustauscher pH-abhängig ist, hatte der Elutionspuffer einen pH-Wert von 8,5, während die Waschschrritte bei pH 6,3 erfolgten.

Protokoll zur Plasmid-Maxipräparation mit dem Nucleobond® AX Kit von Macherey-Nagel

- Bakteriensuspension auf Zentrifugierröhrchen verteilen und 10min bei 4°C und 4500rpm pellettieren
- Pellets in insgesamt 12ml S1-Puffer resuspendieren und poolen
- Mit 12 ml S2-Puffer versetzen → 8x invertieren, 5min Inkubation bei Raumtemperatur
- 12 ml Puffer S3 zufügen → 8x invertieren, 5min auf Eis
- Papierfilter mit destilliertem Wasser befeuchten, in einen Trichter stellen und die Lösung auf den Filter geben
- Die AX500-Säule mit 6ml N2-Puffer equilibrieren
- Filtrat auf die Säule laden und durchfließen lassen
- Säule mit 2x 16ml Puffer N3 waschen
- Elution mit 15ml N5-Puffer

Im Anschluss wurde das Eluat mit Isopropanol gefällt, um die Salze des Elutionspuffers zu entfernen und um das Volumen zu reduzieren.

Fällung von Plasmid-DNA mit Isopropanol

- 15ml Eluat mit 11ml Isopropanol versetzen → 1h bei 4°C und 15000rpm fällen
- Isopropanol abgießen und das Zentrifugierröhrchen umgedreht abtropfen lassen, damit das Pellet nicht durch zurückfließende Isopropanolreste gelöst wird
- Pellet mit 1ml 70% Ethanol überschichten und kurz zentrifugieren
- Ethanol absaugen, Pellet bei Raumtemperatur trocknen lassen
- Getrocknetes Pellet in 200µl Wasser aufnehmen

Die Konzentration der gefällten Plasmid-DNA wurde im Photometer bestimmt.

2.4.10.10 Linearisierung der Plasmid-DNA

Um die Hybridisierung der Primer bei der PCR zu verbessern, wurde das zirkuläre Plasmid durch eine Restriktionsverdauung linearisiert. Dazu wurde ein Restriktionsenzym gewählt, dass nur eine Schnittstelle im pCR2.1 TOPO-Vektor enthält und nicht in der einklonierten Sequenz schneidet. Bei den verwendeten DNA-Sequenzen konnte als Restriktionsenzym für die Linearisierung *Spe1* verwendet werden.

Protokoll für die Linearisierung mit *Spe1*

- 50µg Plasmid-DNA mit Wasser auf ein Volumen von 173µl bringen
- 20µl 10x Puffer und 7µl Enzym *Spe1* (=70U) zufügen
- Inkubation: 2h bei 37°C

Zur anschließenden Entfernung von Puffer und Enzym aus der Plasmid-DNA-Lösung wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die Grundlage ist dabei ein Ausschütteln zwischen einer wässrigen und einer organischen Phase, die auf dem Nernst'schen Verteilungssatz beruht. Dabei wird das Enzym denaturiert und lagert sich gemeinsam mit eventuell vorhandenen Kontaminationen in der organischen Phase oder der Interphase ab, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase bleiben.

Protokoll für die Phenol-Chloroform-Extraktion

- Plasmidlösung mit TE-Puffer auf etwa 100µl bringen und mit einem Überschuss basischem Phenol versetzen → 10min im Multitube-Vortexer schütteln, 10min zentrifugieren
- wässrigen Überstand knapp abheben und in ein neues Eppendorfgefäß, in dem ein Überschuss Chloroform vorgelegt ist, überführen → gründlich vortexen, anschließend zentrifugieren
- den Überstand (enthält die Nukleinsäuren) in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Mit 100µl TE-Puffer nachwaschen: TE-Puffer in das Gefäß mit Phenol geben und vortexen / zentrifugieren
- Wässrige Oberphase in das Gefäß mit dem Chloroform überführen, vortexen und zentrifugieren
- Überstand ebenfalls in das Eppendorfgefäß mit der Nukleinsäuren geben

Nach der Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgte eine Ethanol-fällung, um verbleibende Phenolreste aus der Lösung zu entfernen. Dazu wurde die Lösung mit einem monovalenten Salz, in diesem Falle Natriumacetat, sowie reinem Alkohol versetzt. Die Nukleinsäuren fielen darin aus und konnten pelletiert werden. Durch anschließendes Waschen mit 70%igem Ethanol wurden Salz- und Alkoholreste entfernt.

Protokoll für die Alkoholfällung

Nukleinsäurelösung mit Wasser auf 380µl bringen und mit 20µl 3M Natriumacetat pH 5,0 (=1/20 Volumen der Nukleinsäurelösung) zufügen

- gründlich vortexen
- mit 1000µl 100%igem Ethanol versetzen (=2,5 Volumen der Nukleinsäurelösung)
- mehrmals invertieren, dann Fällung bei -20°C für mindestens 2h
- 5min Raumtemperatur, mehrfach invertieren, Zentrifugation: 2h bei 4°C mit 14000rpm
- Ethanolüberstand mit Vakuumpumpe absaugen, Pellet mit 200µl 70% Ethanol überschichten und zentrifugieren
- Überstand absaugen, Pellet trocknen lassen und in 50µl Wasser aufnehmen

2.4.10.11 Herstellung der Standardreihe

Für die quantitative PCR sind Standards mit exakt bestimmter Kopienzahl erforderlich. Daher erfolgte die Konzentrationsbestimmung im Photometer als Mehrfachbestimmung verschiedener Verdünnungen. Auf dieser Grundlage wurden die Plasmidkopien berechnet und eine Standardreihe in logarithmischen Schritten von 10^7 Kopien bis 10^1 Kopie/10 μ l hergestellt. Verdünnt wurden die Plasmidkopien dabei in nukleasefreiem Wasser, das 10^7 Kopien poly[Inosin]/10 μ l enthält. Das poly[Inosin] diene als Carrier, damit auch in den Standards mit wenigen Plasmidkopien ausreichend Moleküle vorhanden sind. Dadurch waren geringere Verfälschungen der Kopienzahlen durch Moleküle, die an der Wand des Eppendorfgefäßes oder der Pipettenspitze haften, zu erwarten.

2.4.11 Quantitative PCR

Bei der quantitativen PCR wird aus der Amplifikation einer Standardreihe, die bekannte Kopienzahlen der zu quantifizierenden Sequenz enthält, die ursprüngliche Kopienzahl einer unbekannt Probe errechnet. Zum Nachweis wird die amplifizierte DNA durch Fluoreszenz-Farbstoffe sichtbar gemacht, deren Emission das PCR-Gerät detektiert.

Dieses ist zum einen möglich mit einem unspezifisch an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoff wie SYBR Green I. Durch die Bindung steigt die Fluoreszenz des Farbstoffes an. Da jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoffe bindet, ist die Signalstärke hoch. Der Vorteil der unspezifischen Doppelstrang-DNA-Bindung liegt darin, dass der Farbstoff für jedes Amplikon verwendbar ist. Daraus ergibt sich jedoch als Nachteil, dass SYBR Green auch an Artefakte der Reaktion wie beispielsweise Primer-Dimere bindet.

Ein anderes Prinzip beruht darauf, ein oder zwei weitere sequenzspezifische Oligonukleotide zusätzlich zu den Primern zu entwerfen und diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Dabei wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer genutzt: Ein Fluoreszenzfarbstoff lässt sich mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen und strahlt die Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab. Ist in ausreichender Nähe zu diesem ein zweiter Fluoreszenzfarbstoff, der mit der Wellenlänge des abgestrahlten Lichtes des ersten Farbstoffes angeregt wird, kann dieser dadurch die Energie in Licht einer weiteren Wellenlänge umwandeln.

Beim TaqMan-Prinzip befinden sich beide Fluoreszenzfarbstoffe auf einem sequenzspezifischen Oligonukleotid, der Sonde. Gemessen wird die Lichtstärke der Wellenlänge, die vom ersten Fluoreszenzfarbstoff, dem Reporter, freigesetzt wird. Solange der zweite Fluoreszenzfarbstoff, der als Quencher bezeichnet wird, auf demselben

Oligonukleotid sitzt, unterdrückt dieser die messbare Emission. Beim Denaturierungsschritt kann die Sonde an die komplementäre DNA-Sequenz hybridisieren. Trifft die Taq-Polymerase bei der Elongation auf die hybridisierte TaqMan-Sonde, wird durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms der Reporter abgespalten. Das Licht dieser Wellenlänge wird nicht mehr durch den Quencher umgewandelt, sondern in steigender Signalstärke freigesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative PCR in einer 96-well-Platte durchgeführt. Dabei wurde für jedes Primerpaar eine Standardreihe mit Kopienzahlen von 10^1 bis 10^7 in Zehnerpotenz-Abständen verwendet. Das Template (der Standard oder die zu quantifizierende Probe) wurde jeweils als Volumen von 10 μ l vorgelegt, das Gesamtvolumen einer Reaktion betrug 25 μ l.

Zur quantitativen Bestimmung von zellulärer cDNA wurde die cDNA-Menge eingesetzt, die aus 12ng total-RNA revers transkribiert wurde. Bei der Amplifikation von extrazellulärer cDNA aus Serum wurde die gesamte Ausbeute aus einem Milliliter Serum zweigeteilt in einen Ansatz für die Reverse Transkription und eine non-RT-Kontrolle. Davon wurde jeweils 1/10 pro Ansatz in der quantitativen PCR eingesetzt.

Da in den non-RT-Kontrollen der ersten Hälfte der Proben kein PCR-Produkt nachgewiesen wurde, was für das Fehlen von genomischer DNA in den Proben spricht, wurde in den übrigen Proben auf das Mitführen der non-RT-Kontrolle verzichtet. Bei diesen Proben wurde das komplette Eluat einer RNeasy[®]-Säule revers transkribiert und davon ebenfalls 1/10 pro Reaktionsansatz in der quantitativen PCR amplifiziert. Die Standards sowie die non-Template-Kontrollen wurden jeweils als 3-fach-Bestimmung pipettiert. Bei den Proben wurden 2-Fach-Bestimmungen verwendet.

Zum Etablieren der Oligonukleotidprimer für die quantitative PCR wurde eine Detektion mit SYBR Green I durchgeführt.

Protokoll für die quantitative PCR mit SYBR Green I

Pro Reaktionsgefäß in einer 96-well-Platte wurden 10µl Template vorgelegt und 15µl Mastermix zugegeben, der Mastermix wurde zuvor für die entsprechende Anzahl an Reaktionen angesetzt

Mastermix für einen Ansatz:

- 7,625µl Wasser
- 2,5µl 10x-Puffer
- 1µl dNTP (5µM)
- 1,5µl MgCl₂ (50µM)
- 0,125µl Hot GoldStar Enzym (5U/µl)
- 0,75µl fwd-Primer (5µM)
- 0,75µl rev-Primer (5µM)
- 0,75µl SYBR Green I

Die Amplifikation erfolgte in 2 Schritten nach folgendem Protokoll:

- 1) 10 Minuten 95°C (Aktivierung des Hot-Start-Enzyms)
- 2) 15 Sekunden 95°C (Denaturierung)
- 3) 1 Minute 60°C (Annealing und Elongation)

Die Schritte 2 und 3 werden insgesamt 50x durchgeführt.

Nach der Etablierung geeigneter Oligonukleotidprimer wurde für die entsprechende Sequenz eine TaqMan-Sonde konstruiert. Die Sonde liegt als drittes Oligonukleotid zwischen den beiden Primern, die jeweils die Endpunkte des Amplikons markieren.

Verwendete Oligonukleotidprimer (Forward Primer> / <Reverse Primer) und TaqMan-Sonden (Sonde) der vier untersuchten Marker:

1.) Ki-67: Das Amplikon ist 202bp lang, ein Intron wird überspannt.

```

1   ctaccgggcg gaggtgagcg cggcgccggc tcctcctgcg g<gggactttg ggtgcgactt>
61  gacgagcggg ggttcgacaa gtggccttgc gggccggatc gtcccagtgg aagagttgta
121 aatttgcttc tggccttccc ctacggatta tacctggcct tcccctacgg attatactca
181 acttactggt tagaaaatgt ggcccacgag acgcttggtt actatc<aaaa ggagcggggg>
241 cgacgggtccc cactttcccc tgagcctcag cactgcttg tttggaaggg gtattgaatg

```

(Gesamtlänge 12515bp, Quelle der mRNA-Sequenz: National Center for Biotechnology Information database, GeneBank NM_002417)

2.) Rad51: Das Amplikon umfasst 551 bp und ist intronspannend, der Forward Primer liegt auf Exon 1, der Reverse Primer auf Exon 6.

```

1   atggcaatgc agatgcagct tgaagcaaat gcagatactt cagtggaaga agaaagcttt
61  ggcccacaac ccatttcacg gtagagcag tgtggcataa atgccaacga tgtgaagaaa
121 ttggaagaag ctggattcca tactgtggag gctgttgctt <atg<cgccaaa gaaggagcta>
181 ataaatatta agggaattag tgaagccaaa gctgataaaa ttctggctga ggcagctaaa
241 ttagttccaa tgggtttcac cactgcaact gaattccacc aaaggcggtc agagatcata
301 cagattacta ctggctccaa agagcttgac aaactacttc aagggtggaat tgagactgga
361 tctatcacag aaatgtttgg agaattccga actgggaaga cccagatctg tcatacgcta
421 gctgtcacct gccagcttcc cattgaccgg ggtgaaggtg aaggaaaggc catgtacatt
481 gacactgagg gtaccttag gccagaacgg ctgctggcag tggctgagag gtatggtctc
541 tctggcagtg atgtcctgga taatgtagca tatgctcgag cgttcaacac agaccaccag
601 acccagctcc tttatcaagc atcagccatg atggtagaat ctaggtatgc actgcttatt
661 gtagacagtg ccaccgccct ttacagaa<ca gactactcgg gtcgaggtga gctttcagcc

```

(Gesamtlänge 1020 bp, Quelle: National Center for Biotechnology Information database, GeneBank B019705)

3.) Hoj-1: Das Amplikon erstreckt sich über 101bp und überspannt ein Intron.

```

1   agcggaggcg gcgcggggac gggcgctggg cggcccgga gctccgggtg ccgccgcgtc
61  cccagcgcgc cggccggccc ctctgggcgg cctgcggggg cggcgcagtt gcgaaactga
121 gtgcctgtgt agatcatcct agaatacctg tgtgggtgctg <tccttcctca agactacct>c
181 attctcactg gctcggagac tcctgcctgc tgagctgact acacagactt agtc<ttctcc
241 actccgtggt cctgcagcta gagacatgac ctaacaccct gatgaccact ctcagggacc

```

(Gesamtlänge 2337bp, Quelle: National Center for Biotechnology Information database, GeneBank NM_007211)

4.) GAPDH: Primer und TaqMan-Sonde aus dem GAPDH Control Kit von Eurogentec, Sequenz wird nicht angegeben

Die TaqMan-Sonde enthält an beiden Enden jeweils einen Fluoreszenzfarbstoff, im Falle dieser Arbeit am 5'-Ende als Reporter 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) und am 3'-Ende als Quencher 6-Carboxy-tetramethyl-Rhodamin (TAMRA). Da die Taq-Polymerase den Reporter nur bei kompletter Hybridisierung der Sonde an die komplementäre DNA-

Sequenz abspalten kann, ist ein Schmelzpunkt nötig, der 10°C oberhalb des Schmelzpunktes der Oligonukleotidprimer liegt.

Protokoll für die quantitative PCR mit TaqMan-Sonde:

Siehe „Protokoll für die quantitative PCR mit SYBR Green I“, mit einer veränderten Zusammensetzung des Mastermixes:

- 7,375µl Wasser
- 2,5µl 10x-Puffer
- 1µl dNTP (5µM)
- 1,5µl MgCl₂ (50µM)
- 0,125µl Hot GoldStar Enzyme (5U/µl)
- 0,75µl fwd-Primer (5µM)
- 0,75µl rev-Primer (5µM)
- 1µl TaqMan-Sonde (5µM)

Zur Auswertung der quantitativen PCR lassen sich Fluoreszenzkurven der jeweiligen Amplifikationen darstellen. In dem Bereich der Fluoreszenzkurven, in dem die Amplifikation aller Standards exponentiell ist, wird manuell ein Threshold gelegt. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenzkurve einer Probe den Threshold schneidet, wird als ct-Wert bezeichnet. Anhand der ct-Werte der Standards, in denen eine bekannte Templatemenge amplifiziert wurde, lässt sich eine Standardkurve erstellen, in der die ct-Werte gegen die Kopienzahlen aufgetragen sind. Mit Hilfe dieser Kurve werden die Kopienzahlen der unbekanntenen Proben anhand ihrer ct-Werte ermittelt.

Für die Auswertung wurden die Kopienzahlen pro ml Serum berechnet, das entspricht dem zwanzigfachen der Detektion eines PCR-Ansatzes. Da die Untergrenze einer zuverlässigen Detektion mit dem TaqMan-Prinzip bei etwa 5 Kopien liegt, wurden nur die Proben als eindeutig positiv gewertet, in denen mindestens 100 Kopien/ml Serum (= 5 Kopien pro PCR-Ansatz) detektierbar waren. Proben, in denen bei 50 Zyklen keine Amplifikation stattfand, werden als eindeutig negativ gewertet. Wenn die Kopienzahl einer Probe in mindestens einem der beiden Aliquots einer Doppelbestimmung unter 100 pro ml Serum lag, wurde diese Probe als nicht auswertbar bewertet und in der statistischen Auswertung nicht erfasst.

2.4.12 Statistische Auswertung

Aus den Ergebnissen von Doppelbestimmungen in der quantitativen PCR wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Die Darstellung einfacher Werte erfolgte in Balkendiagrammen, bei der Verteilung von

Werten auf mehrere Gruppen wurden Box Plots erstellt. Diese enthalten den Median als zentrale Linie, das erste und dritte Quartil als Begrenzung der Box sowie als „whisker“ die Spannweite der Werte ohne Ausreißer. Extremwerte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen, wurden mit einem Stern markiert; Werte, die über anderthalb Kastenlängen außerhalb liegen, mit einem Kreis.

Korrelationen von intervallskalierten Variablen wie beispielsweise der Kopienzahlen wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet. Dieser Koeffizient entspricht einer Maßzahl, die als r bezeichnet wird und zwischen -1 und $+1$ liegt. $r > 0,7$ wird als starker linearer Zusammenhang interpretiert, $0,3 < r < 0,7$ als mittlerer linearer Zusammenhang und $0,0 < r < 0,3$ als schwacher linearer Zusammenhang.

Wenn eine Variable normal- oder ordinalskaliert ist, erfolgte die Auswertung durch einen Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman. Die statistische Auswertung erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit dem Softwareprogramm SPSS 10.0.7.

3 Ergebnisse

3.1 Detektion von intrazellulären RNA-Spezies in Zellkultur

3.1.1 Auswahl eines Primerpaares für Hoj-1

Veröffentlicht wurden außer der mRNA-Sequenz von Hoj-1 (Quelle: National Center for Biotechnology Information database, GeneBank NM_007211) und den fünf Spleißvarianten (siehe Abbildung 1) auch die Sequenz von Exon 2 (Debeer et al., 2002). Die übrigen Intron-Exon-Grenzen sind nicht publiziert. Mit diesen Angaben wurden drei verschiedene Primerpaare für Hoj-1 entworfen.

mRNA-Sequenz von Hoj-1 mit Sequenzen der verwendeten Primer:

```

1   agcggaggcg gcgcggggac gggcgctggg cggccgcgga gtccegggtg ccgccgcgtc
61  cccagcgcgc cggccggccc ctctggggcg cctgcggggg cggcgcagtt gcgaaactga
121 gtgcctgtgt agatcatcct agaatacctg tgtgggtgctg tecttctca agactacct>c
181 attctcactg gctcggagac tc>ctgcctgc tgagctgact acacagactt agtc<ttctcc
241 actccgtggt cctgc>agcta gagacatgac ctaacaccct <gatgaccact ctcagggacc
301 ttgagtgaact ggccggtgca ccatggaact taaagtatgg gtggatggag ttcagaggat
361 tgtttgtgga gtcactgaag tcacaacttg ccaggaggtt gtcatagcct tagctcaagc
421 aataggtcga actggaaggt acacccttat agagaaatgg agagatactg aaagacactt
481 agcacctcat gaaaatccta tcatatcctt aaacaaatgg gggcagtatg ctagtgatgt
541 gcagctcat<t ctacgacgaa ctgggcccgctc tctcagtgag cgaccactt cagacagtgt
... bis 2337bp

```

Exon 2, **Primerpaar ho2f> / <ho2r**, **Primerpaar ho3f> / <ho4r**, **Primerpaar Hoj-fwd> / <Hoj-rev**

Mit den konstruierten Oligonukleotidpaaren sowie dem internen Standard GAPDH als Positivkontrolle wurde zunächst eine konventionelle PCR mit MCF-7-cDNA als Template durchgeführt, um das am meisten geeignete Primerpaar auszuwählen.

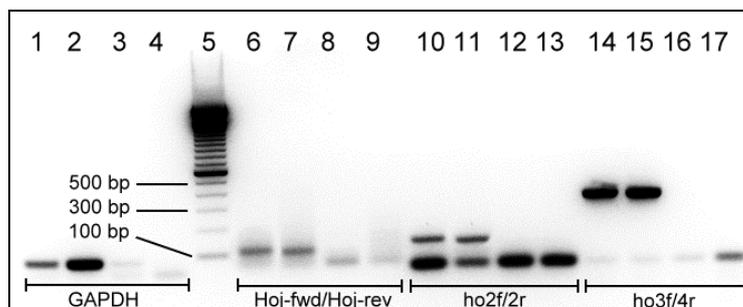


Abbildung 3: PCR mit MCF-7-cDNA und drei unterschiedlichen Hoj-1-Primerpaaren, auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt

Spalten 1, 6, 10 und 14: 10^4 Plasmidkopien als Positivkontrolle

Spalten 2, 7, 11, 15: MCF-7 cDNA

Spalten 3, 8, 12, 16: MCF-7 non-RT

Spalten 4, 9, 13, 17: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA-Leiter

Daraus ergeben sich folgende Erkenntnisse: Hoj-1 mRNA wird ebenso wie GAPDH in MCF-7-Zellen exprimiert. Die verschiedenen Primerpaare für Hoj-1 zeigen dabei eine unterschiedliche Effizienz.

Das Primerpaar ho3f/ho4r (siehe Abbildung 3, Spalten 14-17) ist das Effizienteste, hat allerdings den Nachteil, dass es nach den vorliegenden Informationen nicht sicher intronspannend ist. Dass bei diesem Experiment dennoch keine genomische DNA amplifiziert wurde, deren Genprodukt auf dem Agarosegel nicht von cDNA zu unterscheiden wäre, ergibt sich daraus, dass bei der non-RT-Kontrolle kein PCR-Produkt nachweisbar ist. Das intronspannende Primerpaar ho2f/ho2r (siehe Abbildung 3, Spalten 10-13) ist weniger effizient und weist zudem eine deutliche Doppelbande auf, die eine Größe von unter 100bp hat. Beim Sequenzieren dieser Doppelbande konnten die Sequenzen beider Primer im ansonsten nicht identifizierbaren Produkt gezeigt werden. Bei der quantitativen Hoj-1-Bestimmung stellt die unspezifische zusätzliche Amplifikation jedoch einen entscheidenden Nachteil dar. Das Primerpaar Hoj-fwd/Hoj-rev (siehe Abbildung 3, Spalten 6-9) ist ebenfalls wenig effizient. Der Vorteil dieses Primerpaares liegt jedoch darin, dass keine sichtbaren unspezifischen Nebenprodukte gebildet werden und zudem ein Intron überspannt ist.

Bei der quantitativen PCR mit SYBR Green I verhalten sich die Primerpaare in ihrer Effizienz ähnlicher. Die Standardkurven verlaufen gleichsam, wobei die ct-Werte der Standards bis 10^6 Kopien bei den Primerpaaren ho1f/ho2r und ho3f/4r etwas unterhalb der ct-Werte von den Hoj-fwd/Hoj-rev-Primern liegen. Das Primerpaar ho2f/2r ist durchschnittlich 3,6-mal effizienter als das Paar Hoj-fwd/Hoj-rev, das Paar ho3f/4r um das 2,4-fache. Als Nachweis, dass in der quantitativen PCR die richtigen Sequenzen detektiert werden, dienen die Schmelzkurven.

Da von Hoj-1 verschiedene Splicevarianten bekannt sind und die konstruierten Primerpaare nicht alle das gleiche Konstrukt einschließen, soll bei der konventionellen und der quantitativen PCR jeweils dasselbe Primerpaar verwendet werden. Bei der quantitativen Bestimmung von potentiellen Tumormarkern ist es entscheidend, die falsch-positive Detektion durch Kontaminationen mit genomischer DNA oder unspezifische PCR-Artefakte so gering wie möglich zu halten. Dieses wäre bei den Primerpaaren ho2f/2r und ho3f/4r möglich. Bei den restlichen Experimenten wurde daher das Primerpaar Hoj-fwd und Hoj-rev verwendet.

Der Forward Primer hat eine Schmelztemperatur von 60°C , der Reverse-Primer von 61°C . Das Amplikon besteht aus 101bp und wird bei 81°C aufgeschmolzen. Die TaqMan-Sonde,

die für dieses Primerpaar konstruiert wird, hat folgende Position zwischen den Primern: `gtgctg tccttctca agactacct>c atttctactg gctcggagac tcctgcctgc tgagctgact acacagactt agtc<ttctcc actccgtgtt cctgc`. Die Sonde hat eine Schmelztemperatur von 70°C.

Beispiele für einen Amplifikationsplot und eine Standardkurve des Primerpaares Hoj-fwd/Hoj-rev zeigen folgende Abbildungen:

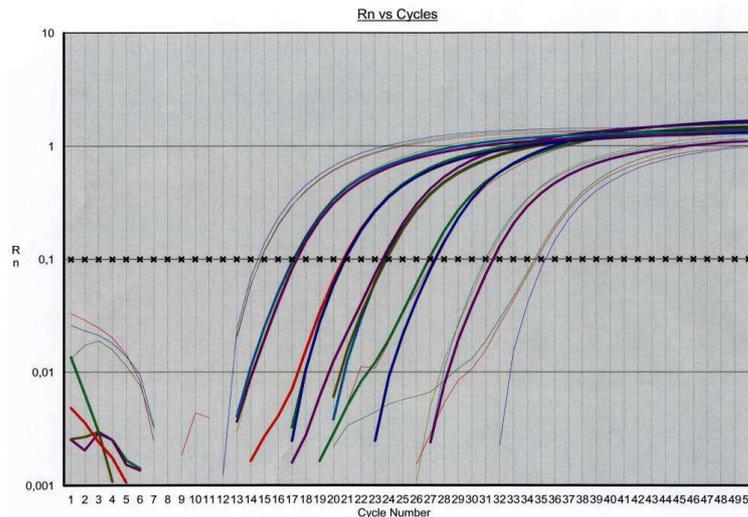


Abbildung 4: Amplifikationskurven der Standards von 10^7 Kopien bis 10^1 Kopie mit dem Primerpaar Hoj-fwd/Hoj-rev

Die Amplifikation erfolgte über 50 Zyklen. Der Threshold wurde manuell auf 0,1 gelegt.

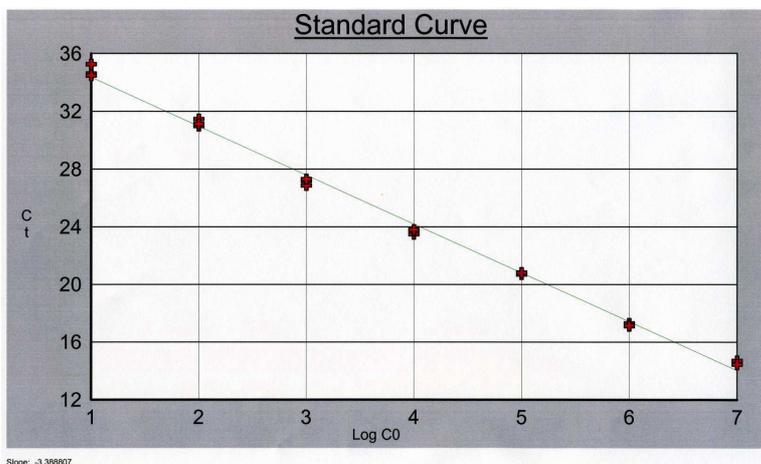


Abbildung 5: Standardkurve der Standards von 10^1 Kopie bis 10^7 Kopien mit dem Primerpaar Hoj-fwd/Hoj-rev

Jeder Standard wurde als Dreifach-Bestimmung amplifiziert.

3.1.2 Qualitativer Nachweis von Hoj-1, Rad51, Ki-67 und GAPDH in verschiedenen Zelllinien

In der cDNA aus zehn verschiedenen Zelllinien wurden Hoj-1, GAPDH, Rad51 und Ki-67 detektiert. Die verwendeten Primerpaare sind alle intronspannend, so dass eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA anhand der Größe auf dem Agarosegel erkannt werden konnten. Dennoch wurde bei der ersten Zelllinie, bei MDA-MB-231, bei allen Primerpaaren eine non-RT-Kontrolle mitgeführt.

3.1.2.1 MDA-MB-231

In der Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinom-Zelllinie waren alle vier getesteten mRNA-Spezies nachweisbar (siehe Abbildung 6):

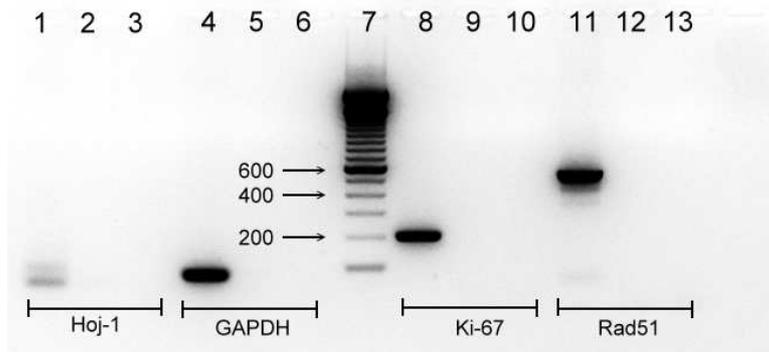


Abbildung 6: Nachweis von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 durch PCR in MDA-MB-231-cDNA

10µl der PCR-Reaktion wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Spalten 1, 4, 8, 11: cDNA

Spalten 2, 5, 9, 12: non-RT

Spalten 3, 6, 10, 13: NTC

Spalte 7 : 100 bp DNA Leiter

Die Bande von Hoj-1 war dabei unter den gegebenen Versuchsbedingungen schwächer als die der anderen drei Primerpaare. Die Höhe der Banden auf dem Gel entspricht der Größe der jeweiligen Sequenzen. Da in den non-RT-Kontrollen kein Signal nachweisbar war, wurde bei den folgenden PCR-Auswertungen auf das Mitführen dieser Kontrolle verzichtet.

3.1.2.2 MCF-7

Auch bei MCF-7, der östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom-Zelllinie, wurden alle vier mRNA-Spezies transkribiert (siehe Abbildung 7):

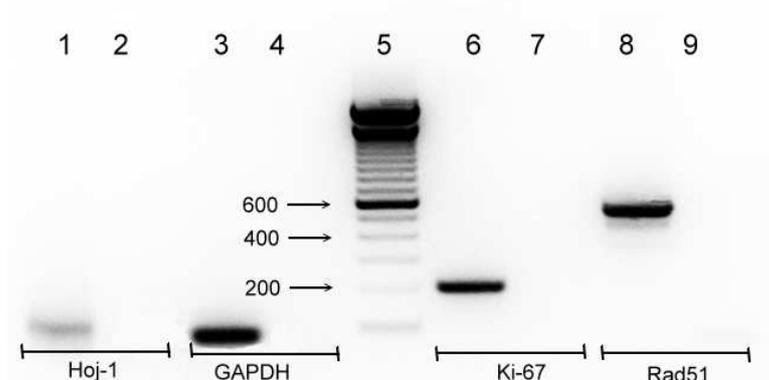


Abbildung 7: Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in MCF-7 cDNA

10µl der PCR-Reaktion wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Spalten 1, 3, 6, 8: MCF-7 cDNA

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

Das schwach ausgeprägte Hoj-1-Signal stellt wahrscheinlich nur einen Teil der messbaren Hoj-a-RNA dar, da mit einem in der konventionellen PCR wenig effizienten Primerpaar detektiert wurde (siehe Abbildung 3).

3.1.2.3 HeLa

HeLa-Zellen exprimieren eindeutig GAPDH, Ki-67 und Rad51 (siehe Abbildung 8):

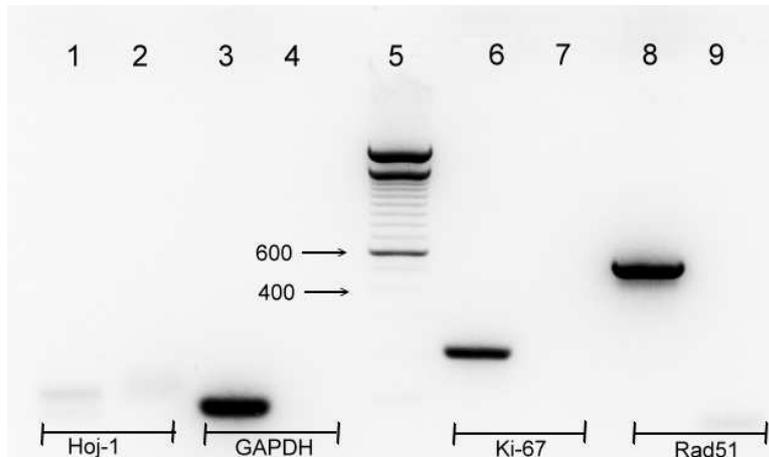


Abbildung 8: Nachweis der vier RNA-Spezies in HeLa cDNA

10µl der PCR-Reaktion wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Spalten 1, 3, 6, 8: HeLa cDNA

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

Eine Detektion von Hoj-1 ist nach diesem Versuch fraglich, da das Signal kaum erkennbar ist.

3.1.2.4 Hec-1A

Bei der konventionellen PCR mit der cDNA aus Hec-1A-Zellen zeigten sich deutliche Signale für GAPDH und Ki-67 (siehe Abbildung 9):

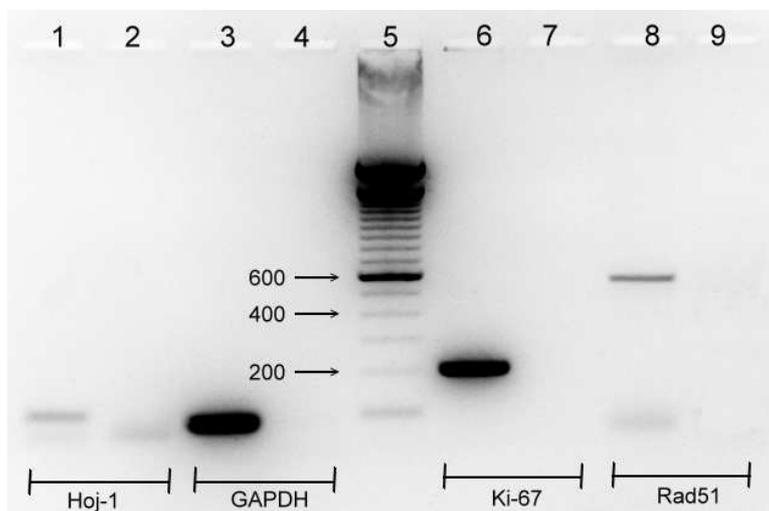


Abbildung 9: Hec-1A cDNA mit Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51

10µl der PCR-Reaktion wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Spalten 1, 3, 6, 8: Hec-1A cDNA

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

Die Bande, die eine Rad51-Amplifikation anzeigt, war bei diesem Experiment ebenso wie das Hoj-1-Signal schwächer.

3.1.2.5 LNCAP

In der Prostatakarzinomzelllinie LNCAP wird ebenfalls eindeutig GAPDH, Ki-67 und Rad51 exprimiert, während für Hoj-1 nur ein sehr schwaches Signal sichtbar ist:

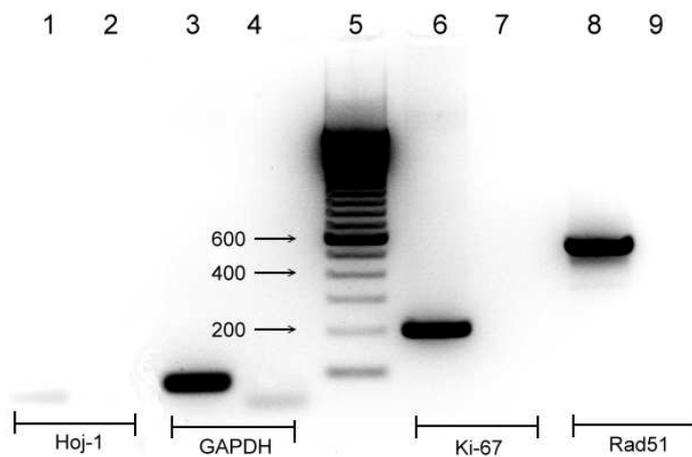


Abbildung 10: qualitativer Nachweis von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in LNCAP

10 μ l der PCR-Reaktion wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Spalten 1, 3, 6, 8: LNCAP cDNA

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

3.1.2.6 ECV-304

In der cDNA aus ECV-Zellen waren alle vier mRNA-Spezies detektierbar (siehe Abbildung 11):

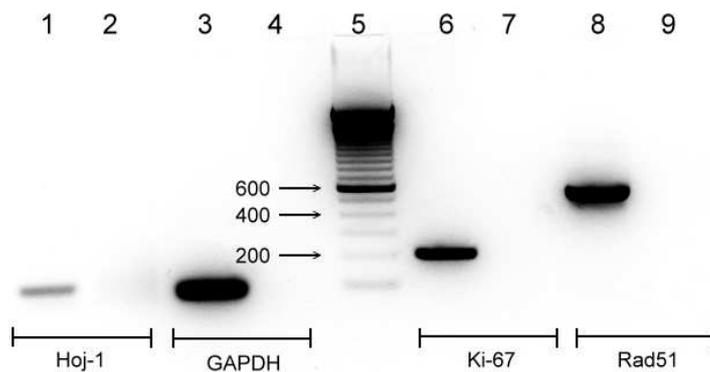


Abbildung 11: Detektion von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in ECV-304 cDNA

10 μ l der PCR-Reaktion wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Spalten 1, 3, 6, 8: ECV-304 cDNA

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

3.1.2.7 HEP-G2

HEP-G2-Zellen exprimieren eindeutig GAPDH, Ki-67 und Rad51, während Hoj-1 in der konventionellen PCR nur ein sehr schwaches Signal bildete (siehe Abbildung 12):

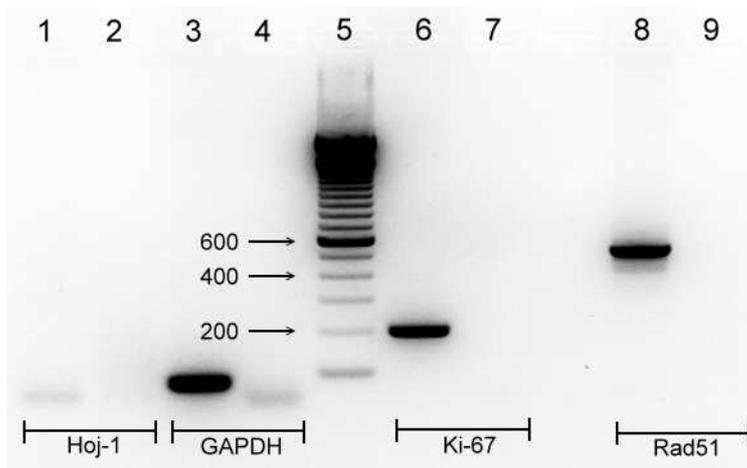


Abbildung 12: PCR mit HEP-G2 cDNA und vier verschiedenen Primerpaaren

10 μ l der PCR-Reaktion wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Spalten 1, 3, 6, 8: HEP-G2 cDNA

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

3.1.2.8 JURKAT

In JURKAT-Zellen werden alle vier detektierten mRNA-Spezies exprimiert (siehe Abbildung 13):

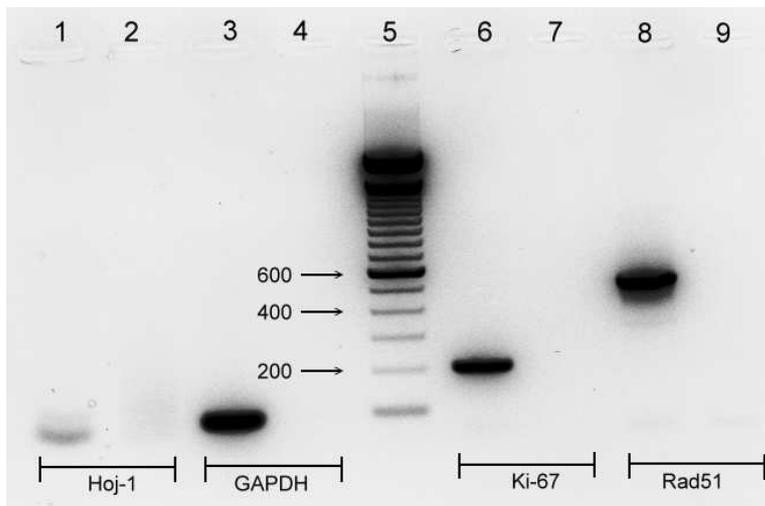


Abbildung 13: Nachweis von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in JURKAT cDNA

10 μ l der PCR-Reaktion wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Spalten 1, 3, 6, 8: JURKAT cDNA

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

3.1.2.9 BJAB

Bei der Zelllinie BJAB, die aus den Burkitt-Lymphomzellen einer weiblichen Patientin etabliert wurde, fiel auf, dass keine Hoj-1-mRNA nachweisbar war (siehe Abbildung 14):

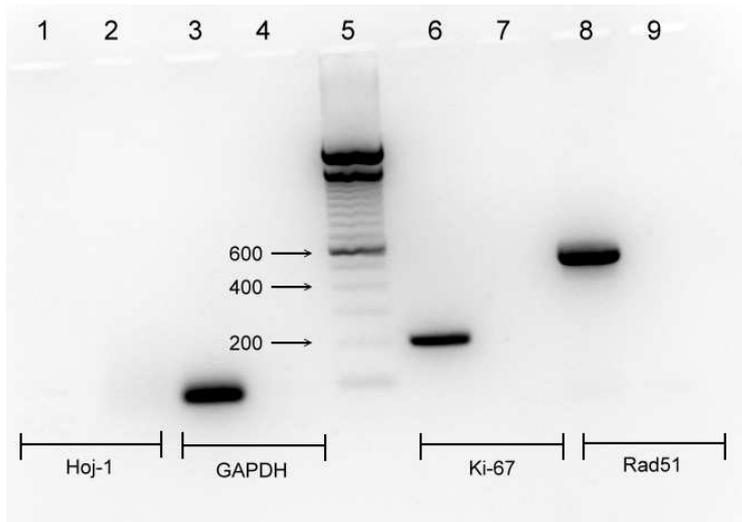


Abbildung 14: Detektion von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in BJAB cDNA

10µl der PCR-Reaktion wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Spalten 1, 3, 6, 8: BJAB cDNA

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

GAPDH, Rad51 und Ki-67 zeigten deutliche Banden.

3.1.2.10 Fibroblasten

In der cDNA aus Fibroblasten amplifizieren alle vier Primerpaare ein PCR-Produkt (siehe Abbildung 15):

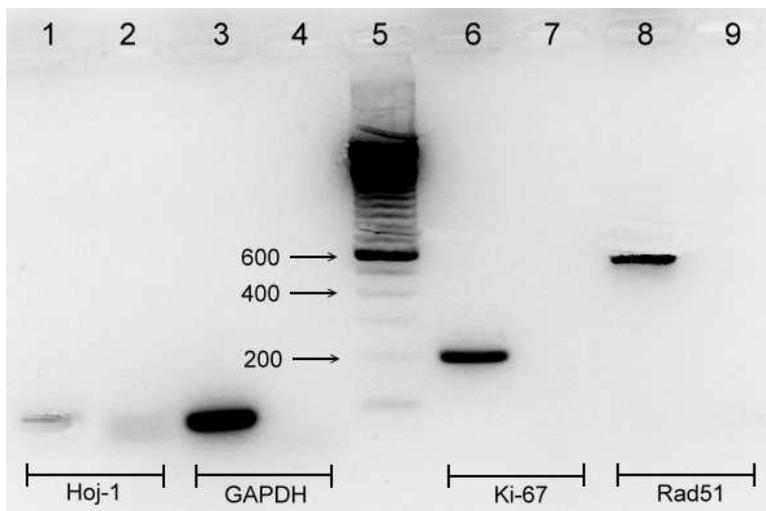


Abbildung 15: Fibroblasten cDNA mit Primern von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51

10µl der PCR-Reaktion wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Spalten 1, 3, 6, 8: Fibroblasten cDNA

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

3.1.3 Eignung von GAPDH als interner Standard

In der quantitativen PCR ergeben sich in den verschiedenen Zelllinien für GAPDH folgende Kopienzahlen pro 12ng RNA (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**):

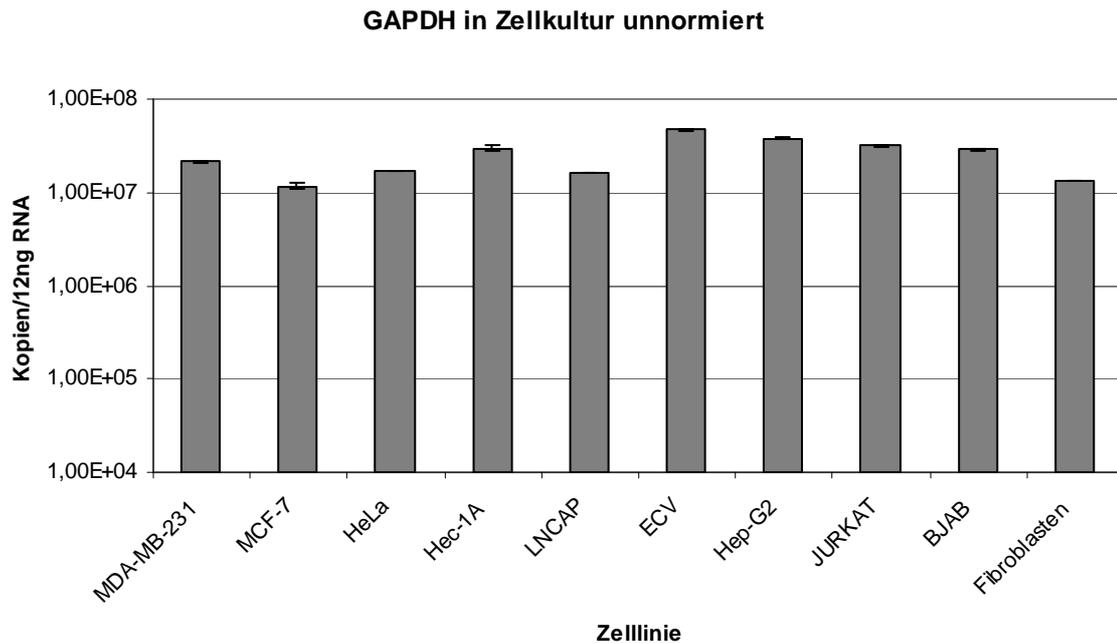


Abbildung 16: GAPDH-Kopien in der cDNA aus 12ng RNA verschiedener Zelllinien. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

In jeder der zehn Zelllinien wurden mehr als 10^7 Kopien GAPDH in der cDNA aus 12ng Gesamt-RNA detektiert. Die größte Differenz bestand dabei zwischen ECV ($4,67 \times 10^7$ Kopien / 12ng RNA) und MCF-7 ($1,17 \times 10^7$ Kopien / 12ng RNA), wobei der Unterschied 75% betrug.

Bei den Konzentrationsmessungen im Photometer ergaben sich bei allen RNA-Proben saubere Spektren, und auch die PAA-Gele deuten nicht auf eine Degradation hin. Die Korrelation der Nachweisbarkeit des internen Markers GAPDH mit dem Vorhandensein von intakter RNA war somit für die Fragestellungen dieser Arbeit ausreichend.

3.1.4 Quantitative Unterschiede der Expression von Hoj-1, Rad51 und Ki-67 in verschiedenen Zelllinien

In zwei biologischen Experimenten, die jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt wurden, zeigt sich bei der quantitativen Bestimmung von Hoj-1, Rad51 und Ki-67 ohne Normierung folgendes Ergebnis:

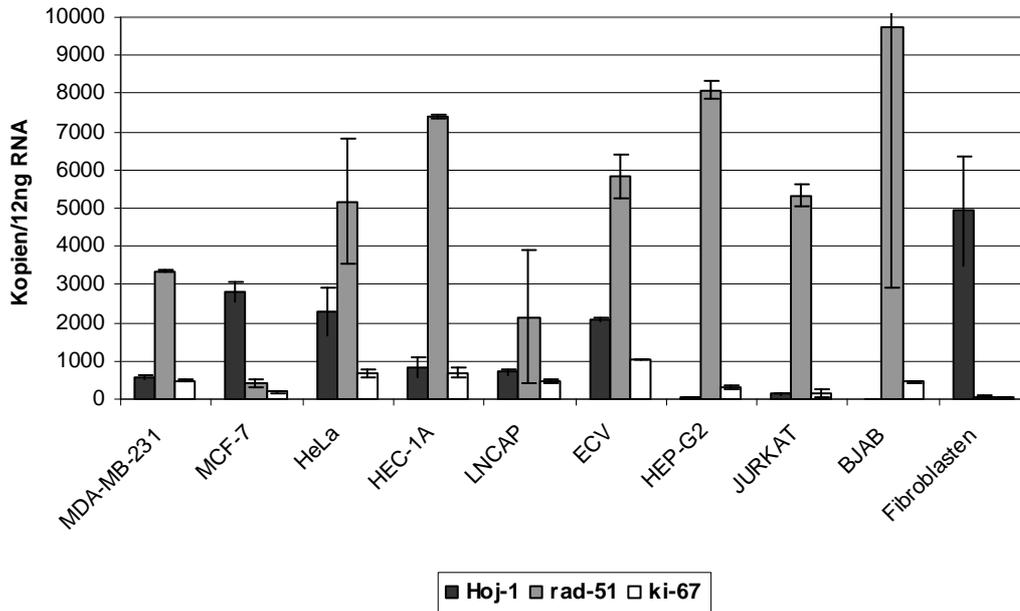


Abbildung 17: Kopienzahlen von Hoj-1, Rad51 und Ki-67 in der cDNA aus 12ng RNA ohne Normierung. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Dabei wurde ersichtlich, dass Rad51 in allen Zelllinien außer in MCF-7 und Fibroblasten von den drei detektierten mRNA-Spezies die höchste Expression hat. Die Kopienzahl von Rad51 lag immer oberhalb der von Ki-67, wobei sich das Verhältnis zwischen den verschiedenen Zelllinien deutlich unterscheidet. Es waren Unterschiede zwischen einem Faktor von 2,3 bei MCF-7-Zellen und einem Faktor von 34,0 bei JURKAT feststellbar.

Die quantitativen Ergebnisse der Hoj-1-Detektion erklären zudem zumindest in einigen Zelllinien die schwachen Banden in der konventionellen PCR: Es wurde genau zehnmal mehr RNA eingesetzt als bei der quantitativen PCR. Somit war die Hoj-1-Kopienzahl in HEP-G2 deutlich unter 10^3 Kopien pro 120ng Gesamt-RNA, und in MDA-MB-231, JURKAT, Hec-1A und LNCAP lag sie unter 10^4 Kopien.

Quantitativ variiert die Expression von Hoj-1 im Verhältnis zu Rad51 und Ki-67 in den verschiedenen Zelllinien am meisten. Während in BJAB-Zellen überhaupt kein Nachweis von Hoj-1 mRNA gelang und in HEP-G2 und JURKAT nur sehr wenig exprimiert wurde, konnte im Gegensatz dazu in MCF-7-Zellen und in Fibroblasten mehr Hoj-1 gezeigt werden als Rad51 und Ki-67. Wurden die Kopienzahlen von Hoj-1, Rad51 und Ki-67 jeweils auf GAPDH normiert, verstärkte sich die Tendenz, dass vor allem in der Hoj-1-Expression deutliche Unterschiede bestehen:

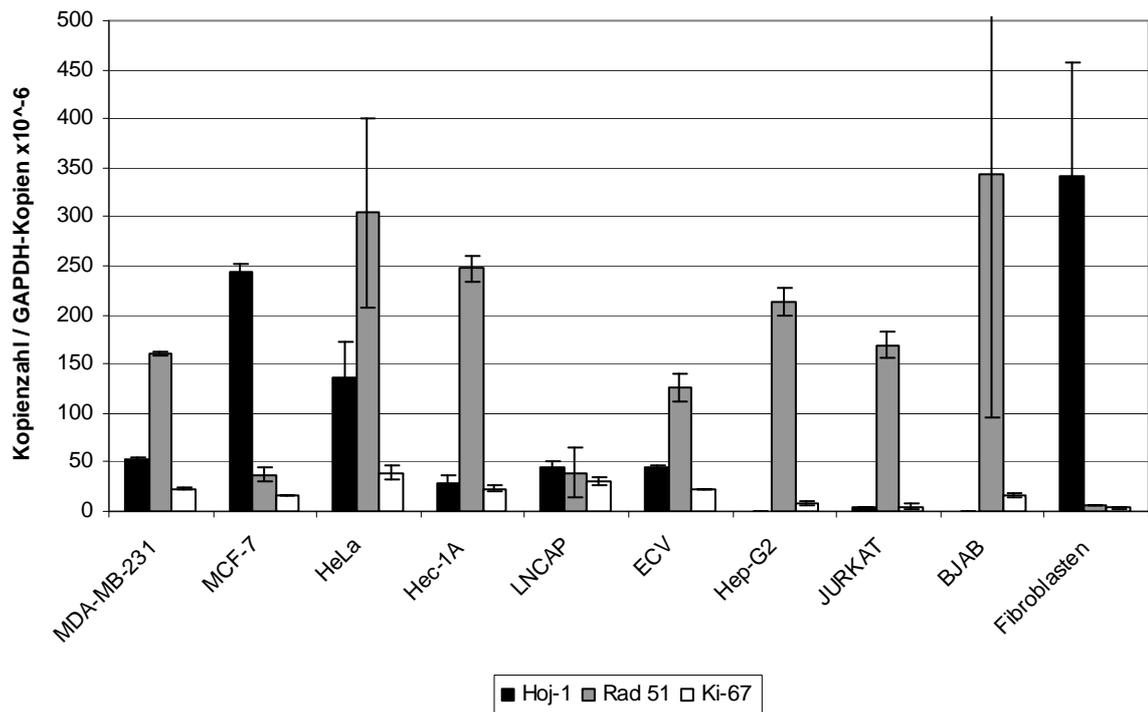


Abbildung 18: Kopienzahlen von Hoj-1, Rad51 und Ki-67 in den verschiedenen Zelllinien nach der Normierung auf die GAPDH-Expression. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.1.5 Expressionsmuster der vier detektierten mRNA-Spezies in den beiden Mammakarzinom-Zelllinien

Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigten beim Vergleich der beiden Mammakarzinom-Zelllinien, bei denen MCF-7 im Gegensatz zu MDA-MB-231 Hormonrezeptoren exprimiert, ein differentielles Bild.

Die Absolutwerte der Kopienzahlen, die durchschnittlich pro 12ng zellulärer total-RNA nach der reversen Transkription mittels quantitativer PCR detektiert werden, sind folgende:

	GAPDH	Rad51	Ki-67	Hoj-1
MCF-7	$1,2 \times 10^7 (\pm 9,1 \times 10^5)$	432 ($\pm 103,69$)	191 ($\pm 14,56$)	2811 ($\pm 270,44$)
MDA-MB-231	$2,1 \times 10^7 (\pm 2,1 \times 10^5)$	3355 ($\pm 40,92$)	490 ($\pm 14,2$)	586 ($\pm 41,66$)

Tabelle 1: RNA-Expressionen der Mammakarzinom-Zelllinien unnormiert (in Klammern: Standardabweichung)

Wurden in den beiden Zelllinien jeweils die Kopienzahl von Rad51, Ki-67 und Hoj-1 auf 10^7 Kopien GAPDH bezogen, ergeben sich folgende Werte:

	GAPDH	Rad51	Ki-67	Hoj-1
MCF-7	10 ⁷	369 (±59,8)	163 (±0,4)	2401 (±42,5)
MDA-MB-231	10 ⁷	1575 (±34,9)	230 (±4,4)	275 (±22,3)

Tabelle 2: RNA-Expressionen in Mammakarzinom-Zelllinien bezogen auf GAPDH (in Klammern: Standardabweichung, berechnet aus den Mittelwerten aus zwei unterschiedlichen biologischen Experimenten, jeweils bezogen auf 10⁷ Kopien GAPDH)

Wie in der Tabelle ersichtlich ist, wurde in der hormonrezeptorpositiven Zelllinie MCF-7 mehr Hoj-1 als Ki-67 exprimiert (Faktor 14,7) sowie mehr Hoj-1 als Rad51 (Faktor 6,5). Zusätzlich war in MCF-7-Zellen deutlich mehr Hoj-1 detektierbar als in MDA-MB-231-Zellen (Faktor 8,7). In der hormonrezeptornegativen Zelllinie MDA-MB-231 hingegen wurde etwa gleich viel Hoj-1 exprimiert wie Ki-67 (Faktor 1,2) und weniger Hoj-1 als Rad51 (Faktor 0,2).

3.2 Überprüfung von intrazellulärer RNA aus Leukozyten auf das Vorhandensein der gesuchten mRNA-Spezies

3.2.1 In Leukozyten ist qualitativ nur GAPDH nachweisbar

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus Leukozyten einer weiblichen und einer männlichen Person RNA isoliert und auf die Expression der vier verschiedenen Amplikons überprüft. Damit ist ein Überblick über die Genexpression aller kernhaltigen Zellen des Blutes – dazu zählen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten – möglich.

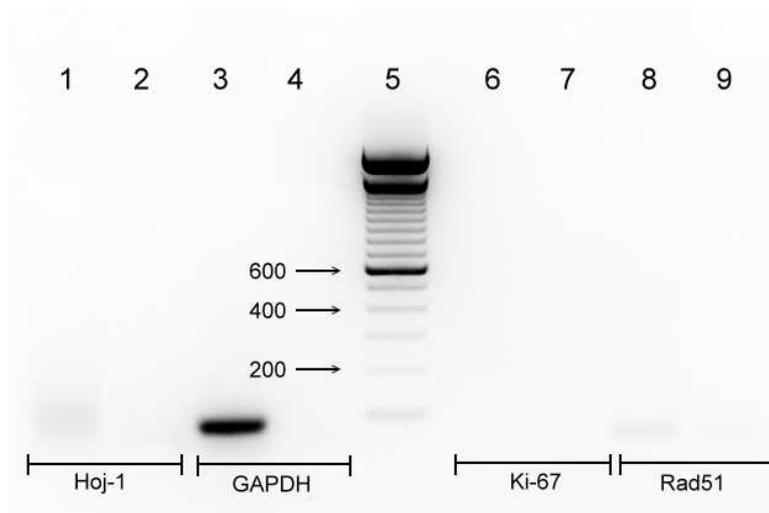


Abbildung 19: Detektion mit cDNA aus männlichen Leukozyten

Spalten 1, 3, 6, 8: cDNA aus männlichen MNC

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

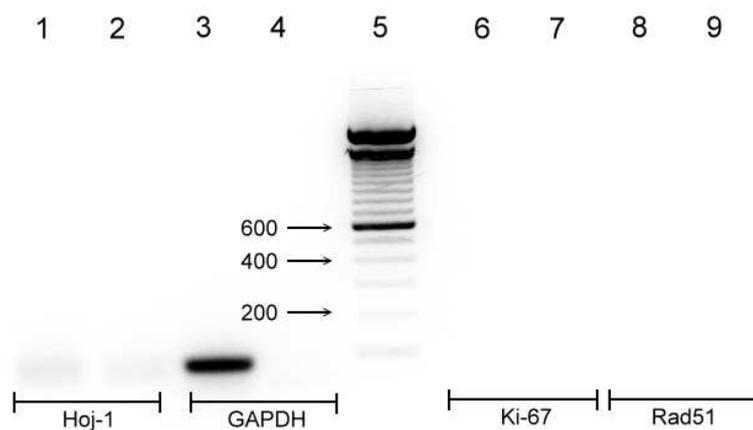


Abbildung 20: PCR mit cDNA aus weiblichen Leukozyten

Spalten 1, 3, 6, 8: cDNA aus weiblichen MNC

Spalten 2, 4, 7, 9: NTC

Spalte 5: 100 bp DNA Leiter

Sowohl in den Leukozyten der männlichen Testperson als auch in denen der Weiblichen wurde kein Hoj-1, Ki-67 und Rad51 exprimiert. GAPDH war hingegen amplifizierbar, ein Nachweis dafür, dass bei der Präparation intakte RNA isoliert wurde.

3.2.2 Die quantitative PCR bestätigt bei Leukozyten das Ergebnis der konventionellen PCR

Quantitativ war in Leukozyten-cDNA ebenfalls nur GAPDH nachweisbar, während Hoj-1, Ki-67 und Rad51 auch in Mehrfachbestimmungen bei keiner der präparierten RNA-Proben messbar waren (siehe Abbildung 21):

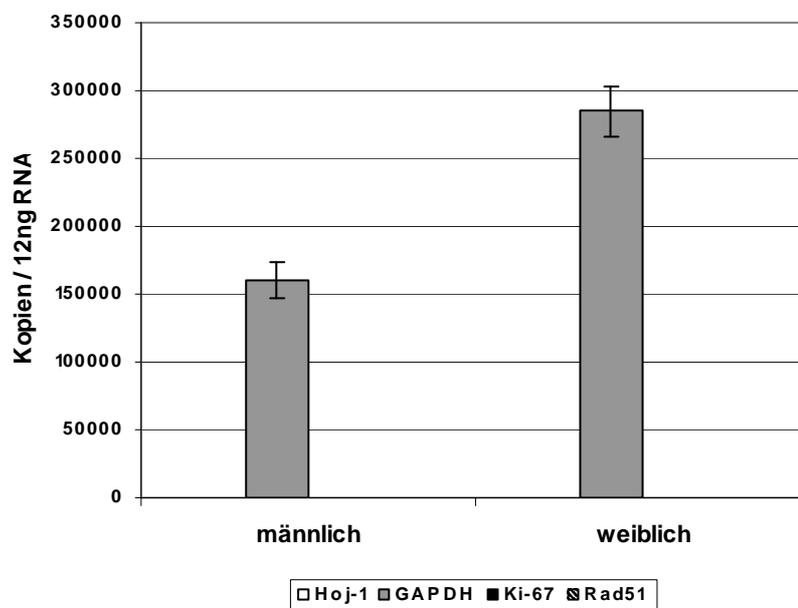


Abbildung 21:
Kopienzahlen von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in der cDNA von 12ng total-RNA aus Leukozyten

Fehlerbalken = Standardabweichung

3.3 Analyse von ausgewählten RNA-Spezies in extrazellulärer RNA aus dem Serum von Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen

3.3.1 GAPDH-Bestimmung

3.3.1.1 In allen Serumproben ist GAPDH detektierbar

In allen Serumproben, sowohl denen der Kontrollgruppe als auch den Proben von Brustkrebspatientinnen, war GAPDH nachweisbar. Dabei verteilten sich die Werte in der Kontrollgruppe und der Patientengruppe folgendermaßen (siehe Abbildung 22):

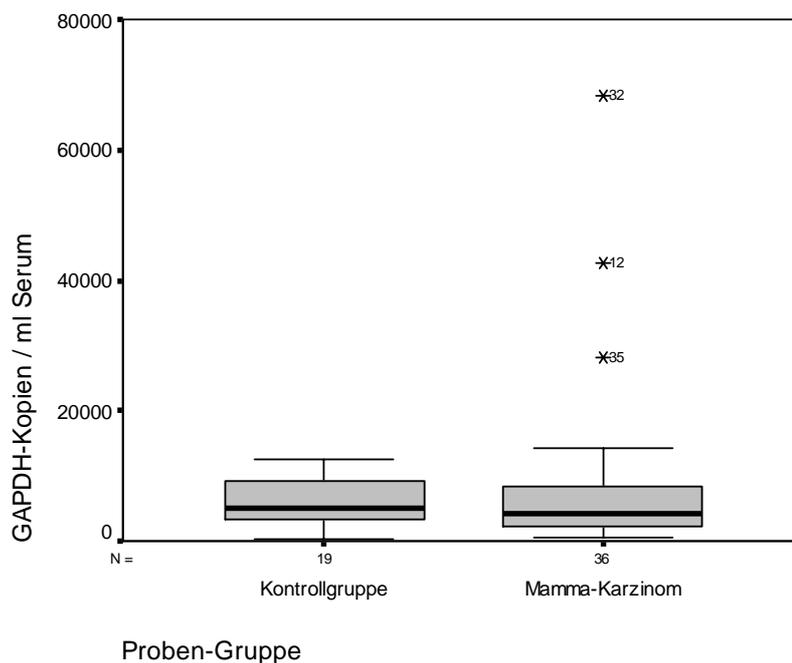


Abbildung 22: Boxplot-Darstellung der gemessenen GAPDH-RNA-Kopien pro ml Serum

zentrale Linie = Median

Begrenzung der Box = erstes und drittes Quartil

whisker = Spannweite der Werte ohne Ausreißer

Stern = Extremwerte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen

Bis auf drei Serumproben der Patientengruppe, in denen vergleichsweise höhere GAPDH-Werte detektiert wurden, lagen die gemessenen Kopienzahlen bei gesunden Frauen und Mammakarzinompatientinnen im gleichen Bereich. Ein Balkendiagramm mit den GAPDH-Kopienzahlen der einzelnen Proben wird im Anhang aufgeführt (siehe 7.3).

3.3.1.2 GAPDH-RNA korreliert im Serum von Brustkrebspatientinnen mit keinem Prognose-Parameter

Eine Korrelationsanalyse von GAPDH und jeweils einer weiteren Variable wurde nach Pearson beziehungsweise Spearman (siehe 2.4.12) durchgeführt. Dabei konnten nur die Ergebnisse der Detektionen aus Serumproben von Brustkrebspatientinnen analysiert werden. Eine Überprüfung der Kontrollgruppe war nicht möglich, da diese Proben anonymisiert wurden und keine weiteren Daten vorlagen.

Die Korrelationsanalyse lieferte folgende Ergebnisse:

Variable	Skalenniveau	Testverfahren	Korrelationskoeffizient	statistische Signifikanz
Alter der Patientin	verhältnisskaliert	Korrelationskoeffizient nach Pearson	-0,09	/
Her2-neu-Status	nominalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,10	/
Östrogen- / Progesteron-Rezeptorstatus	nominalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,01	/
Tumorgroße nach UICC 2002	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,26	/
Anzahl befallener Lymphknoten	verhältnisskaliert	Korrelationskoeffizient nach Pearson	0,08	/
Grading nach Elston und Ellis	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,17	/
Nottingham-Prognosescore	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,18	/

Tabelle 3: Korrelationsanalyse der GAPDH-Kopienzahlen mit verschiedenen Parametern

Es ist folglich unter diesen Versuchsbedingungen keine statistisch signifikante Korrelation zwischen zirkulierender GAPDH mRNA und Prognoseparametern des Mammakarzinoms erkennbar.

3.3.2 Ki-67-Bestimmung

3.3.2.1 Ergebnisse der Ki-67-Detektion

Bei den Serumproben der Patientengruppe wurde Ki-67 in vier von 36 Proben eindeutig detektiert (11,1%), bei der Kontrollgruppe in zwei von 19 Proben (10,5%). In der folgenden Boxplot-Abbildung wurden nur die Proben berücksichtigt, in denen Ki-67 entweder eindeutig nachgewiesen wurde (in der Doppelbestimmung der revers transkribierten Probe jeweils über 100 Kopien pro ml Serum detektierbar, in der nonRT-Kontrolle keine Amplifikation eines Produktes) oder in der Doppelbestimmung zweimal nicht detektierbar war. Die Ergebnisse aller einzelnen Proben sind im Anhang als Balkendiagramm dargestellt (siehe 7.3).

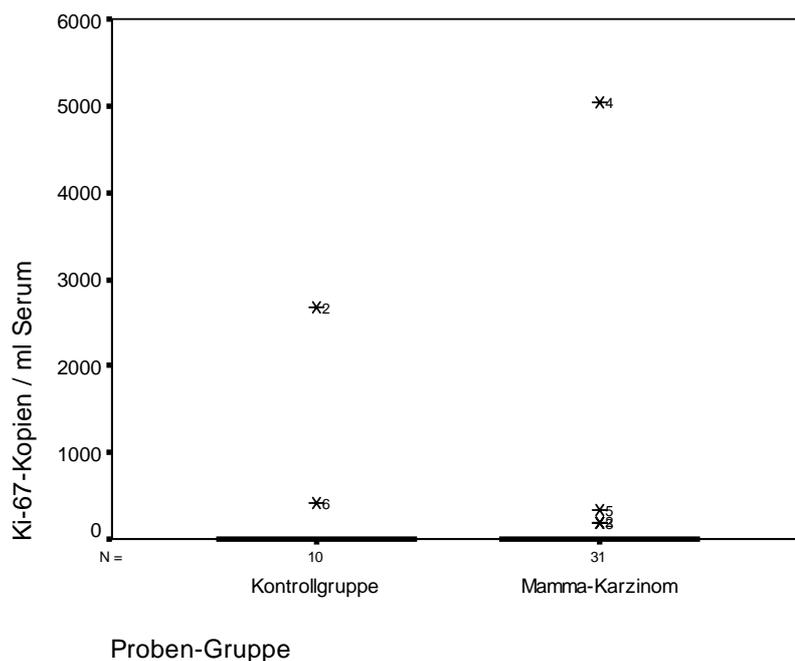


Abbildung 23: Boxplot-Darstellung der gemessenen Kopienzahlen für Ki-67 RNA in der Patienten- und der Kontrollgruppe

zentrale Linie = Median

Stern = Ausreißer

Der Median lag bei beiden Gruppen bei null, so dass die Einzelproben, in denen zellfreie Ki-67 cDNA detektierbar war, als Ausreißer gelten. Einzelne Ki-67-Detektionen waren in beiden Gruppen, bei Mammakarzinompatientinnen und bei gesunden Frauen, möglich.

3.3.2.2 Korrelationsanalyse von Ki-67-RNA bei Brustkrebspatientinnen mit verschiedenen Variablen

Variable	Skalenniveau	Testverfahren	Korrelationskoeffizient	statistische Signifikanz
Alter der Patientin	verhältnisskaliert	Korrelationskoeffizient nach Pearson	0,16	/
Her2-neu-Status	nominalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,1	/
Östrogen- / Progesteron-Rezeptorstatus	nominalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	-0,03	/
Tumorgroße nach UICC 2002	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	-0,11	/
Anzahl befallener Lymphknoten	verhältnisskaliert	Korrelationskoeffizient nach Pearson	-0,1	/
Grading nach Elston und Ellis	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,28	/
Nottingham-Prognosescore	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,02	/

Tabelle 4: Korrelationsanalyse der Ki-67-Kopienzahlen mit verschiedenen Parametern

Auch bei Ki-67 konnte keine Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern festgestellt werden.

3.3.3 Rad51-Bestimmung

3.3.3.1 Ergebnisse der Quantifizierung von Rad51-cDNA im Serum

Bei der Detektion von Rad51 im Serum war die mRNA-Spezies in dieser Arbeit in drei von 36 Patientenproben (8,3%) und in einer von 19 Kontrollproben (5,3%) eindeutig nachweisbar. Uneindeutige Proben, bei denen in der Doppelbestimmung mindestens einmal eine Kopienzahl unter 100 Kopien / ml Serum detektiert wurde, konnten nur als nicht auswertbar beurteilt werden und sind daher in der folgenden Abbildung nicht berücksichtigt.

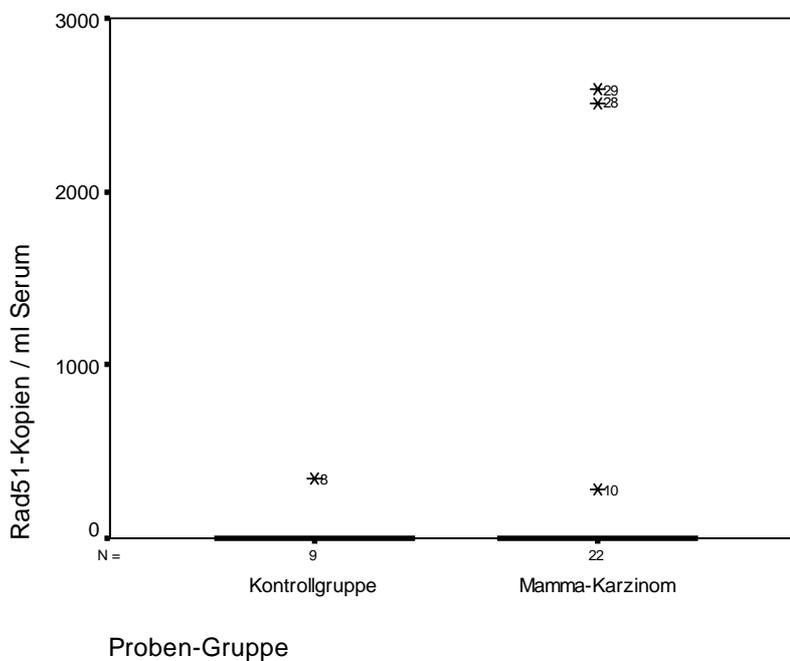


Abbildung 24: Rad51-Kopien pro ml Serum bei der Kontroll- und der Patientengruppe, dargestellt als Boxplot

zentrale Linie = Median

Stern = Ausreißer

3.3.3.2 Ergebnisse der Korrelationsanalyse von Rad51 im Serum der Patientengruppe mit verschiedenen Variablen

Variable	Skalenniveau	Testverfahren	Korrelationskoeffizient	statistische Signifikanz
Alter der Patientin	verhältnisskaliert	Korrelationskoeffizient nach Pearson	-0,46	signifikant auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig)
Her2-neu-Status	nominalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,34	/
Östrogen- / Progesteron-Rezeptorstatus	nominalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,19	/
Tumorgröße nach UICC 2002	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	-0,26	/
Anzahl befallener Lymphknoten	verhältnisskaliert	Korrelationskoeffizient nach Pearson	-0,06	/
Grading nach Elston und Ellis	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	-0,24	/
Nottingham-Prognosescore	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	-0,16	/

Tabelle 5: Korrelationsanalyse der Rad51-RNA-Kopienzahl mit verschiedenen Parametern

Bei den Patientenproben fand sich eine negative Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Rad51 mRNA im Serum und dem Alter der Patientin zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Allerdings beruht dieses Ergebnis auf lediglich drei von 36 Serumproben, in denen Rad51 nachweisbar war. Weitere Korrelationen sind nicht erkennbar.

3.3.4 Hoj-1-Bestimmung

3.3.4.1 Ergebnisse der quantitativen Hoj-1-Bestimmung

Von 36 Serumproben von Mammakarzinompatientinnen war in vier Proben (entspricht 11,1%) eindeutig Hoj-1 detektierbar, in diesen Fällen war Hoj-1 in beiden Aliquots einer Doppelbestimmung mit über 100 Kopien / ml Serum detektierbar.

Bei den 19 Kontrollproben konnte Hoj-1 in sieben Proben (entspricht 36,8%) eindeutig detektiert werden. In der Quantität der gemessenen Kopienzahlen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe.

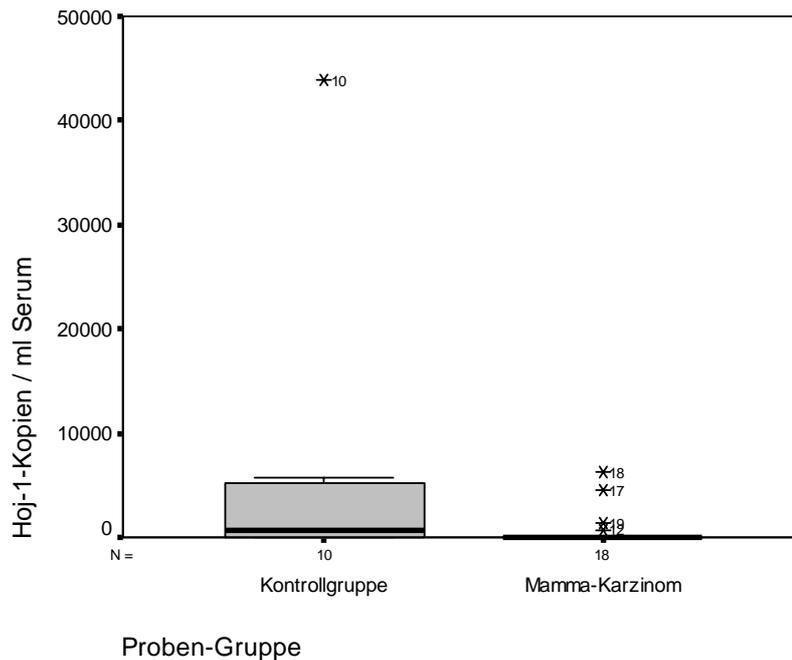


Abbildung 25: Boxplot der Hoj-1-RNA-Kopien pro ml Serum bei der Kontroll- und der Patientengruppe

zentrale Linie = Median

Begrenzung der Box = erstes und drittes Quartil

whisker = Spannweite der Werte ohne Ausreißer

Stern = Extremwerte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen

Die nicht auswertbaren Proben sind in der Abbildung nicht aufgeführt.

Der Median betrug bei der Patientinnengruppe null Kopien, bei der Kontrollgruppe lag dieser bei 775 Kopien Hoj-1 pro ml Serum. Bei den Serumproben, in denen Hoj-1 nachgewiesen wurde, lagen die Kopienzahlen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe im selben Bereich.

3.3.4.2 Korrelationen von Hoj-1-RNA im Serum der Patientengruppe mit verschiedenen Variablen

Variable	Skalenniveau	Testverfahren	Korrelationskoeffizient	statistische Signifikanz
Alter der Patientin	verhältnisskaliert	Korrelationskoeffizient nach Pearson	-0,01	/
Her2-neu-Status	Nominalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,06	/
Östrogen- / Progesteron-Rezeptorstatus	Nominalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	-0,39	/
Tumorgröße nach UICC 2002	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,09	/
Anzahl befallener Lymphknoten	verhältnisskaliert	Korrelationskoeffizient nach Pearson	-0,19	/
Grading nach Elston und Ellis	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,2	/
Nottingham-Prognosescore	ordinalskaliert	Rangkorrelation nach Spearman	0,11	/

Tabelle 6: Korrelationsanalyse der Hoj-1-Kopienzahl mit verschiedenen Parametern

Bei den Patientenproben fand sich unter den gegebenen Bedingungen keine Korrelation zwischen einem Nachweis von freier Hoj-1 mRNA im Serum und einem Prognosefaktor des Mammakarzinoms.

3.3.5 Unterschiede der Serum-RNA zwischen hormonabhängigen und hormonunabhängigen Tumoren

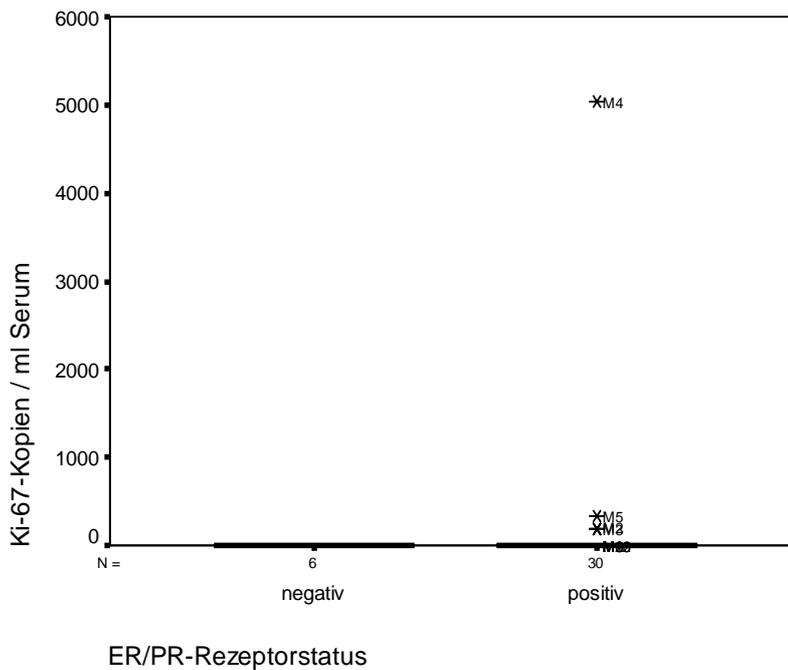


Abbildung 26: Boxplot-Darstellung der Ki-67-Kopien / ml Serum bei hormonrezeptor-positiven bzw. negativen Tumoren

Ki-67 mRNA konnte nur im Serum von Mammakarzinompatientinnen detektiert werden, deren Tumor Hormonrezeptoren exprimiert. Allerdings lag der Median der nachgewiesenen Ki-67 Kopien auch bei den hormonabhängigen Tumoren bei null.

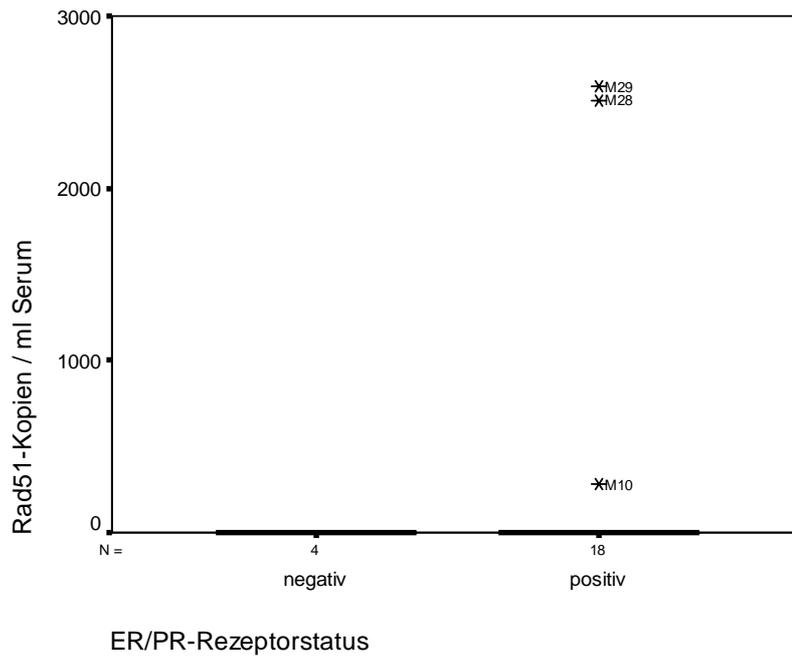


Abbildung 27: Rad51-Kopien im Serum, dargestellt nach dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus

Rad51 ist in 22 Proben eindeutig detektierbar oder nicht detektierbar (siehe 2.4.11), davon sind 18 Proben Hormonrezeptorabhängig.

Ebenso wie Ki-67 konnte auch Rad51 nur im Serum von Frauen mit einem hormonabhängigen Mammakarzinom nachgewiesen werden. Die mRNA-Spezies konnte jedoch auch bei den rezeptorpositiven Tumoren nur in drei von 18 Proben gezeigt werden, der Median betrug bei beiden Gruppen null.

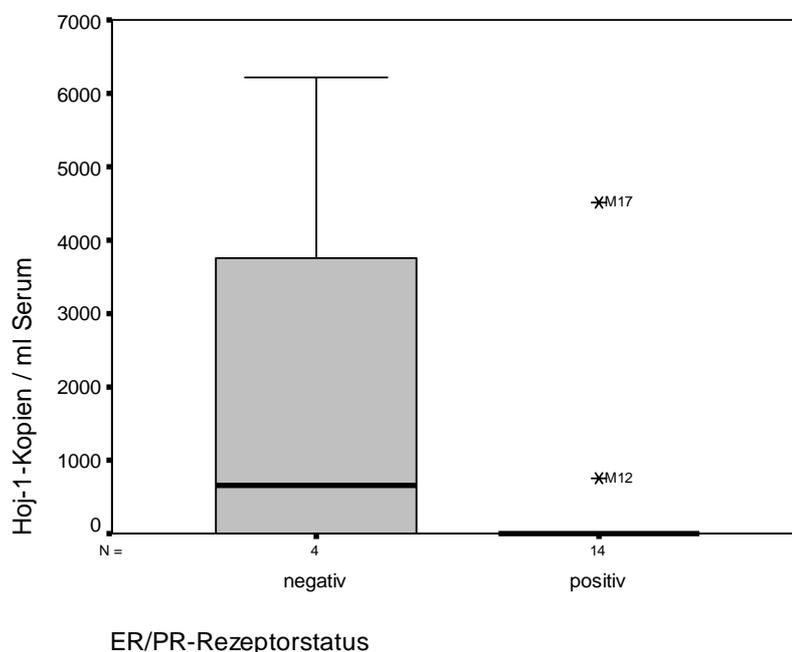


Abbildung 28: Hoj-1-Kopien im Serum von Patientinnen mit Hormonabhängigem oder -unabhängigem Mammakarzinom

zentrale Linie = Median

Begrenzung der Box = erstes und drittes Quartil

whisker = Spannweite der Werte ohne Ausreißer

Stern = Extremwerte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen

In 18 Proben war Hoj-1 definitiv messbar oder eindeutig negativ.

Von den Proben, in denen ein eindeutiges Ergebnis der Hoj-1-Detektion vorlag, waren vier Hormonrezeptor negativ und 14 positiv. Hoj-1-RNA wurde in allen Rezeptornegativen Seren nachgewiesen. Bei den Proben von Patientinnen mit Östrogen- oder Progesteronsensitivem Mammakarzinom war Hoj-1 in zwei von 14 Fällen im Serum vorhanden.

3.3.6 Korrelieren in den einzelnen Proben GAPDH, Ki-67, Rad51 und Hoj-1 miteinander?

Eine Korrelation der vier detektierten mRNA-Sequenzen miteinander konnte in den einzelnen Proben nicht gesehen werden (siehe 7.1). Weder besteht eine Assoziation von Hoj-1, Ki-67 oder Rad51 mit einer im Vergleich zu den anderen Proben hohen oder niedrigen Anzahl an GAPDH-Kopien im Serum, noch lässt sich aus dem Vorhandensein von einer der mRNA-Spezies auf die Existenz anderer zirkulierender RNA schließen.

4 Diskussion

4.1 Zellkulturergebnisse

Neun verschiedene Tumorzelllinien wurden beispielhaft für unterschiedliche Tumorentitäten untersucht. Das *housekeeping*-Gen GAPDH konnte in allen untersuchten Tumorzelllinien mit jeweils über 10^7 Kopien in der cDNA aus 12ng Gesamt-RNA vergleichbar gut detektiert werden. Die nachgewiesenen Kopienzahlen der drei potentiellen Tumormarker variierten hingegen deutlich zwischen den verschiedenen Zelllinien und lagen zwischen nicht detektierbar (Hoj-1 in BJAB) und $9,7 \times 10^3$ Kopien (Rad51 in BJAB) in der cDNA aus 12ng Gesamt-RNA. Die absoluten Mengen an Rad51- und Ki-67-RNA verhielten sich dabei in allen untersuchten Zelllinien gleichartig, wobei in allen Fällen mehr Rad51- als Ki-67-Kopien nachgewiesen werden konnten. Hoj-1 zeigte dagegen eine deutlichere Variation zwischen den Tumorzelllinien. So war in BJAB-Zellen im Gegensatz zu Rad51 und Ki-67 keine Hoj-1-mRNA nachweisbar, und in HEP-G2- und JURKAT-Zellen lag die Anzahl der detektierten Hoj-1-mRNA Kopien unterhalb der von Ki-67. In den Zelllinien MDA-MB-231, HeLa, HEC-1A, LNCAP und ECV war weniger Hoj-1-mRNA als Rad51-mRNA nachweisbar, jedoch lag die absolute Menge an Hoj-1-mRNA über der Ki-67-mRNA-Menge.

In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 waren als einzige Tumorzelllinie mehr Hoj-1-mRNA Kopien nachweisbar als Rad51- oder Ki-67-mRNA. Nach einer Normierung der absoluten RNA-Werte auf die Expression von GAPDH war dieser Unterschied noch deutlicher erkennbar. Somit erscheint Hoj-1 als potentieller Tumormarker zur Brustkrebsdiagnostik besonders geeignet. Außerdem war es im Zellkultursystem möglich, anhand der Hoj-1-Expression zwischen der hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und den hormonrezeptornegativen Brustkrebszellen MDA-MB-231 zu unterscheiden. Da der Hormonrezeptorstatus Auswirkungen auf die Prognose von Malignomen der Brustdrüse hat, könnte Hoj-1 auch als Prognosefaktor bedeutsam sein.

Die einzige nicht-transformierte Zelllinie, die untersucht wurde, waren Fibroblasten. Hier lag die nachweisbare Menge an Hoj-1-mRNA ebenfalls über der detektierten Kopienzahl von Rad51- und Ki-67-mRNA. Die Hoj-1-Expression ist anhand der vorliegenden Daten und der aktuellen Literatur nicht erklärbar. Eine Interpretationsmöglichkeit liegt in der Proliferationsstimulation durch das Zellkulturmedium. Die Fibroblasten-Kultur wurde als einzige Zelllinie in einem Nährmedium kultiviert, das 20% FKS enthielt. Alle anderen

Zelllinien erhielten ein Medium mit einem Zusatz von 10% FKS. Im FKS sind Wachstumsfaktoren enthalten, die Einfluss auf Proliferationsfaktoren der Zellen haben. Eine verdoppelte FKS-Konzentration im Medium könnte daher auch die erhöhte Expression von Hoj-1 bedingen. Im Widerspruch dazu steht jedoch die deutlich niedrigere Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in Fibroblasten im Vergleich zu den neun Tumorzelllinien. Die Ergebnisse der Hoj-1-Expression in Fibroblasten, die aus einer Hautprobe eines gesunden Mannes gewonnen wurden, deuten auf eine mögliche Störgröße bei Hoj-1-Detektionen *in vivo* hin.

Anhand von Zellzählungen vor der RNA-Präparation, Konzentrationsbestimmungen der präparierten RNA sowie quantitativer PCR aus der cDNA von 12ng Gesamt-RNA lässt sich berechnen, wie viele Kopien einer bestimmten RNA-Spezies pro Zelle nachweisbar sind. Aufgrund einer nicht ausreichend großen Präzision der Zellzählung und der Konzentrationsbestimmung sind die errechneten Werte jedoch eher als Tendenz denn als Absolutwerte zu verstehen. Für die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 ließ sich ermitteln, dass aus einer einzelnen Zelle durchschnittlich sieben Hoj-1-cDNA Kopien detektiert werden konnten (Standardabweichung: ± 2 Kopien). In Bezug auf zirkulierende Tumorzellen im Serum bedeutet dies, dass mit der vorliegenden Methode ein nachweisbares Signal produziert werden könnte, wenn 14 Tumorzellen pro ml Serum rupturiert wären. Da nachgewiesen wurde, dass aus Malignomen durchschnittlich 10^6 Tumorzellen pro Tag und pro Gramm Tumorgewebe in die Blutzirkulation übergehen (Carmeliet und Jain, 2000), ist diese Menge theoretisch leicht erreichbar. Allerdings ist fraglich, ob RNA aus destruierten Tumorzellen tatsächlich präparierbar wäre. So konnte gezeigt werden, dass exogene RNA, die in Serum pipettiert wird, innerhalb weniger Sekunden durch RNasen abgebaut wird und nicht mehr durch eine real-time PCR detektiert werden kann (Tsui et al, 2002). Diese exogene RNA ist mit intrazellulärer RNA aus rupturierten Tumorzellen strukturell vergleichbar.

4.2 Bedeutung der RNA-Expression in Leukozyten

Das Blutserum, aus der die Isolierung der zirkulierenden RNA erfolgte, ist zellfrei. Allerdings kann ein Rupturieren einzelner Blutzellen bei der Blutentnahme oder bei der anschließenden Zentrifugation der Serummonovette nicht ausgeschlossen werden. Ein Persistieren von zellulärer RNA im Serum ist trotz der vorhandenen RNasen theoretisch denkbar. Eine Ribonukleinsäure, die als potentieller Tumormarker in Frage kommt, sollte somit in Blutzellen nicht exprimiert werden. Das ist bei den überprüften RNA-Spezies

Hoj-1, Ki-67 und Rad51 der Fall. Erklärt werden kann die Abwesenheit von Proliferationsfaktoren und anderen potentiell das Tumorzellwachstum fördernden RNA-Markern dadurch, dass Blutzellen erst als reife Zellen den Blutkreislauf erreichen. Die Neubildung und Differenzierung erfolgt zuvor im Knochenmark. Reife Blutzellen exprimieren nur noch die mRNA für essentielle Proteine des Zellstoffwechsels. Vor allem Granulozyten, die den Hauptanteil der kernhaltigen Blutzellen darstellen, zeigen nur eine minimale Proteinsynthesefähigkeit.

4.3 Bestimmung der mRNA-Marker im Serum

In allen der 45 untersuchten Serumproben war GAPDH-mRNA nachweisbar. Dieses zeigt, dass es mit der verwendeten Methode grundsätzlich möglich ist, detektierbare zirkulierende RNA aus Blut zu isolieren.

Mit keinem der vier detektierten RNA-Marker war es bei der verwendeten Methode jedoch möglich, zwischen Patientenproben und der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Ursächlich dafür könnten entweder suboptimale Versuchsbedingungen oder biologische Gründe sein.

Im Anschluss an die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde im Rahmen einer Kooperation eine zweite Analyse von RNA aus Plasma durchgeführt. Dabei wurde die cDNA von Hoj-1, Ki-67, Rad51 und GAPDH in Proben von Mammakarzinompatientinnen, Patientinnen mit Fibroadenomen der Mamma sowie gesunden Frauen detektiert. Bis auf die RNA-Isolierung wurde dasselbe System zur Analyse verwendet wie in dieser Arbeit, auch die Chemikalien waren größtenteils identisch. Als Ergebnis erwies sich Hoj-1 als potenter Marker zur Diskriminierung zwischen einem Mammakarzinom und einem gutartigen Fibroadenom.

Die RNA-Isolierung wurde für diese Versuche mit einer aktivierten Silikalösung durchgeführt, die durch eine Aufschlemmung mit Salzsäure eine positive Ladung erhalten hatte (Tamkovich et al., 2004). Diese Methode war auch für die vorliegende Arbeit in Betracht gezogen worden. Für den Array, der als Vorversuch dieser Analysen auf Hoj-1 als möglichen Tumormarker hingewiesen hatte, wurde die Serum-RNA ebenfalls nach diesem Verfahren präpariert.

Doch obwohl sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass durch die Methode mit aktivierter Silikasuspension extrazelluläre RNA effizienter isoliert wurde, waren die Ergebnisse schwerer reproduzierbar und weniger konstant als bei einem kommerziellen Säulensystem. Aus diesem Grund war die Wahl auf ein Kit mit einer Silikasäule gefallen.

Die Ergebnisse der Kooperationsgruppe zeigen jedoch, dass das im Rahmen dieser Arbeit

etablierte System zur Detektion von Hoj-1 sensitive Ergebnisse ermöglicht, sofern eine geeignete RNA-Präparation vorliegt. Diese Versuche demonstrierten zudem die Eignung von Hoj-1 als Tumormarker für das Mammakarzinom.

4.3.1 Ki-67

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen korreliert Ki-67-mRNA im Serum von Mammakarzinompatientinnen nicht mit dem Grading des Tumors. Da eine Fragmentierung extrazellulärer RNA gezeigt werden konnte (El-Hefnawy et al., 2004), kommt als Ursache für falsch-negative Ergebnisse die Amplikonlänge von 201bp in Betracht. Andererseits war es mit dem verwendeten Amplikon möglich, freie Ki-67-mRNA im Urin zu detektieren und dort einen Zusammenhang zum Harnblasenkarzinom zu erkennen (Menke et al., 2004). Ob ein Unterschied zwischen zirkulierender RNA im Urin und im Blutserum besteht, ist bislang nicht bekannt.

In nachfolgenden Experimenten einer kooperierenden Arbeitsgruppe konnte jedoch nach einer anderen RNA-Präparation mit demselben System wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Ki-67-Kopien im Plasma von gesunden Frauen (n=21) und im Plasma von unbehandelten Mammakarzinompatientinnen (n=22) besteht. Außerdem korrelierte die Ki-67-Kopienzahl im Plasma mit der Anzahl der GAPDH-Kopien. Nach diesen Ergebnissen könnte Ki-67-mRNA ein geeigneter Marker zur Mammakarzinomdiagnostik sein.

4.3.2 Rad51

Nach den vorliegenden Ergebnissen korreliert Rad51 im Serum nicht wie im Tumorgewebe mit dem histologischem Grading und dem Östrogenrezeptorstatus. Beim Hormonrezeptorstatus zeigt sich sogar eine gegenläufige Tendenz: Während Rad51 im Tumorgewebe mit Hormonrezeptornegativen Zellen assoziiert ist, konnte es extrazellulär nur im Serum von Patientinnen mit rezeptorpositiven Tumoren gefunden werden. Dieses Ergebnis beruht jedoch lediglich auf drei von 36 Serumproben, in denen Rad51 nachweisbar war.

Eine Fehlerquelle bei den gewählten Versuchsbedingungen könnte in der Länge des Rad51-Amplikons von 551bp liegen. Denn es besteht das Risiko, dass vorhandene Rad51-Transkripte durch Fragmentierung nicht die erforderliche Transkriptlänge zur Hybridisierung beider Primerpaare aufweisen. Zum anderen sind die Versuchsbedingungen für die PCR-Reaktion bei einer Amplikongröße über 100bp nicht mehr optimal (Bustin,

2000). So könnte die Elongationszeit von einer Minute zu kurz gewesen sein, obwohl die Amplifikation der Rad51-Standards möglich war.

4.3.3 Hoj-1

Unter diesen Versuchsbedingungen erscheint Hoj-1 im Serum nicht als geeigneter Tumormarker für Mammakarzinome. Es gelang weder ein konsistenter Nachweis von Hoj-1 in den Serumproben der Mammakarzinompatientinnen, noch ist anhand der Detektion eine Unterscheidung zur Kontrollgruppe möglich. Auch Korrelationen zu klinisch-pathologischen Parametern oder Prognosefaktoren sind nicht erkennbar.

Doch anschließende Versuche einer kooperierenden Arbeitsgruppe zeigen, dass durch eine Versuchsänderung bei der RNA-Präparation die Unterscheidung zwischen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen sowie Fibroadenompatientinnen anhand der Hoj-1-Expression möglich ist (siehe 4.3). Zudem ist eine Korrelation zwischen Hoj-1 und GAPDH im Serum zu erkennen. Somit scheint das negative Ergebnis der Hoj-1-Analyse in der vorliegenden Arbeit kein biologisches Problem zu sein, sondern eine experimentelle Ursache zu haben.

Zusammen mit den Ergebnissen des Arrays und der Zellkulturen erscheint Hoj-1 damit als der beste Marker unter den vier Getesteten. Zudem wird Hoj-1 in Blutzellen nicht exprimiert, so dass eine hohe Spezifität der Methode möglich ist: falsch-positive Werte durch zelluläre mRNA aus zerstörten Leukozyten sind nicht zu erwarten.

Daher sollten mit dem gleichen System, aber veränderter RNA-Isolation weitere Experimente erfolgen, um die Eignung von Hoj-1 als Tumormarker darzustellen. Dabei sollte eine Analyse der Korrelation zum Hormonrezeptorstatus erfolgen und überprüft werden, ob mit Hoj-1 Aussagen zum Grading oder zur Prognose gemacht werden können.

4.3.4 GAPDH

GAPDH war in allen untersuchten Serumproben nachzuweisen. Der Durchschnittswert der GAPDH-Bestimmung bei den Patientenproben lag bei $8,9 \times 10^3$ Kopien/ml (Standardabweichung $1,4 \times 10^4$ Kopien/ml), bei der Kontrollgruppe bei $4,3 \times 10^3$ Kopien/ml (Standardabweichung $4,4 \times 10^3$ Kopien/ml).

In der Literatur sind nur wenige qPCR-Daten über Kopienzahlen von zirkulierender GAPDH-mRNA im Blut verfügbar, die zudem alle von der gleichen Arbeitsgruppe stammen. Die Angaben liegen im Bereich von 0,1-1ng/ml, bei einer GAPDH-Größe von 5378 Basen entspricht das etwa 3×10^{13} - 3×10^{14} Kopien/ml (Ng et al., 2002; Tsui et al., 2002). Eine andere Gruppe konnte mit einem auf Fluoreszenz basierendem SYBR-Green-

Assay bei gesunden Frauen und bei Mammakarzinompatientinnen im Plasma GAPDH-Konzentrationen zwischen null und 291ng/ml feststellen (Laktionov et al., 2004). Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt jedoch bei 10ng/ml (Morozkin et al., 2003). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe, die im Plasma für die Gesamt-RNA Konzentrationen von 1-10ng/ml ermittelte (El-Hefnawy et al., 2004).

Ein Unterschied zwischen Tumorpatienten und Gesunden ist dabei anhand der GAPDH-Kopienzahl im Serum nicht ersichtlich. Auch bei den anschließenden Detektionen der kooperierenden Arbeitsgruppe mit dem gleichen System zeigte sich kein Unterschied in der GAPDH-Kopienzahl zwischen gesunden Frauen und Patientinnen mit einem gutartigen oder bösartigen Tumor der Brustdrüse.

In der vorliegenden Arbeit wurde GAPDH als interner Standard verwendet, der das Vorhandensein von detektierbarer RNA nach der Präparation sicherstellen sollte. Dieses Ziel wurde erreicht.

Über das Potential von GAPDH als Tumormarker wurde bereits diskutiert. So wurde stellte Revillion fest, dass beim Mammakarzinom im Tumorgewebe negative Korrelationen bestehen zwischen der GAPDH-Expression und einem Alter von über 40 Jahren bei der Diagnose sowie dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus. Eine positive Korrelation wurde zwischen der GAPDH-Kopienzahl und dem histologischem Grading gesehen. Die Konklusion der Autoren ist eine Assoziation von der GAPDH-Expression mit der Zellproliferation bei Brustkrebs und der Aggressivität des Tumors (Revillion et al., 2000). Diese Ergebnisse sind mit der verwendeten Methode extrazellulär im Serum nicht zu bestätigen.

4.4 Vergleich der Zellkulturergebnisse mit denen aus Serum

Die Ergebnisse der Zellkultur lassen sich mit der verwendeten Methode im Serum nicht bestätigen. Die Marker Ki-67, Rad51 und Hoj-1 werden im Zellkultursystem exprimiert, finden sich aber nicht in allen Serumproben von Mammakarzinompatientinnen wieder.

Schon im Verhältnis zwischen den Kopienzahlen der verschiedenen Marker gibt es deutlich Unterschiede. Während im Zellkultursystem die Differenz zwischen GAPDH und den anderen drei Markern mindestens 10^7 beträgt, sind die Unterschiede im Serum um mehrere Zehnerpotenzen geringer. In einer Serumprobe der Kontrollgruppe konnte sogar mehr Hoj-1 als GAPDH detektiert werden.

Allerdings wurde bei dieser Fragestellung extrazelluläre RNA mit Zellulärer verglichen. Die zirkulierenden Nukleinsäuren unterscheiden sich nach den aktuellen Erkenntnissen

nicht nur durch den Degradationsschutz von zellulärer RNA. So wurde festgestellt, dass RNA im Serum zumindest größtenteils fragmentiert vorliegt (El-Hefnawy et al., 2004). Diese Tatsache hat eine große Bedeutung für die Amplifikation mit einer PCR-Reaktion, denn gerade bei Amplikonlängen von über 100bp besteht die Gefahr, dass jeweils nur ein Primer hybridisieren kann und nicht beide. Somit ist es denkbar, dass mit einem gleichen Primerpaar extrazellulär ein deutlich geringer Prozentsatz der RNA-Kopien detektiert werden kann als intrazellulär. Variationen könnten auch dadurch zustande gekommen sein, dass die verwendeten Primerpaare nicht alle im gleichen Bereich der jeweiligen Ribonukleinsäuren liegen.

Die unterschiedlichen Expressionen der Marker bei einer hormonrezeptorpositiven und einer hormonrezeptornegativen Zelllinie lassen sich unter den gewählten Versuchsbedingungen im Serum nicht reproduzieren. Allerdings wurde für jede Gruppe nur eine Zelllinie untersucht, die jeweils aus dem Tumorgewebe eines einzelnen Mammakarzinoms etabliert wurde. Für ein repräsentatives Zellkulturergebnis wäre die Überprüfung einer größeren Anzahl von Mammakarzinom-Zelllinien notwendig gewesen. Zudem handelt es sich bei Zellkulturen um ein artifizielles System. Die vielfältigen Einflüsse des Organismus auf einen Zellverband entfallen, stattdessen erfolgt eine Wachstumsstimulation durch das Medium. Dadurch sind auch Auswirkungen auf die Expression von Proliferationsfaktoren, zu denen beispielsweise auch Ki-67 gehört, möglich.

4.5 Eignung eines Arrays zur Etablierung neuer Tumormarker

Nach den vorliegenden Ergebnissen erscheint ein Array mit gepoolten Proben zunächst nicht geeignet zur Etablierung eines neuen Tumormarkers. Der Marker Hoj-1, der bei den Mammakarzinomproben im Gegensatz zu den Serumproben gesunder Frauen ein signifikantes Signal ergab, stellte sich im Einzelnachweis als nicht sensitiv zur Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen heraus.

Allerdings wurde die Serum-RNA für den Array anders präpariert als für die PCR-Einzelbestimmungen: Die Isolierung für den Microarray erfolgte nach einem Protokoll mit aktivierter Silikasuspension und unter variierten Pufferbedingungen (Tamkovich et al., 2004). Nach dem gleichen Protokoll wurde auch von der kooperierenden Arbeitsgruppe extrazelluläre Plasma-RNA isoliert (siehe 4.3). Für die RT-qPCR wurde hingegen auch in den im Anschluss an diese Arbeit durchgeführten Versuchen das gleiche Protokoll wie beschrieben (siehe 2.4.7 und 2.4.11) verwendet. Bei diesen Versuchen zeigte sich analog

zum Array erneut, dass mit Hilfe des Markers Hoj-1 eine Unterscheidung zwischen Patientinnen mit Mammakarzinom und gesunden Frauen möglich ist. Somit konnte das Ergebnis des Arrays nachträglich im Einzelnachweis bestätigt werden.

In der Literatur werden Arrays bevorzugt verwendet, um Gruppen von Genen zu erkennen, dessen Überexpression mit bestimmten Prognosefaktoren korreliert (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; van't Veer et al., 2002; Ahr et al., 2002; van de Vijver et al., 2002; Ramaswamy et al., 2003). Bei Einzelproben ist es eine zeitaufwendige und kostenintensive Methode, die zur Routinediagnostik ungeeignet ist.

Dagegen erscheint es praxisrelevanter, in einem Array mit gepoolten Proben potentielle Marker herauszufinden und diese dann im Einzelnachweis mit PCR zu testen. Im vorliegenden Fall war es durch den Array möglich, einen bislang nicht beschriebenen potentiellen Tumormarker für das Mammakarzinom ausfindig zu machen.

4.6 Diagnostische Anwendbarkeit des Verfahrens mit Diskussion möglicher Fehlerquellen

4.6.1 Blutentnahme

Das verwendete Serum wurde bei der Patientengruppe in einer zusätzlichen Monovette im Rahmen einer Routineblutentnahme gewonnen, während bei der Kontrollgruppe die Venenpunktion ausschließlich für diese Studie erfolgte. Wird das Serumröhrchen zur RNA-Präparation zuerst abgenommen, wie es bei den Kontrollproben der Fall war, ist die Gefahr einer Kontamination mit Hautzellen am größten. Auch in der Literatur wird eine Verunreinigung durch Epithelzellen bei der Blutentnahme als Quelle für falsch-positive Resultate diskutiert (Gilbey et al., 2004).

Die PCR-Versuche mit cDNA aus Fibroblasten ergaben, dass diese mehr Hoj-1 exprimieren als Rad51 und Ki-67. Diese Primärzelllinie wurde aus einer Hautprobe eines gesunden Menschen etabliert. Somit könnten Bindegewebszellen der Haut vor allem für die Hoj-1-Kopien, die in den Serumproben der Kontrollgruppe detektiert wurden, ein Ursprung sein. Zukünftig könnte diese Fehlerquelle umgangen werden, indem bei Blutentnahmen für eine RNA-Analyse immer die erste Monovette verworfen wird.

4.6.2 Behandlung der Serumröhrchen

Neben der Blutentnahme bei Mammakarzinompatientinnen erfolgte auch die Zentrifugation und Gewinnung des Serums sowie das Schockgefrieren in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in Lübeck. Der Zeitabstand bis zum Einfrieren einer

Probe war nicht normiert. Auch der Zeitraum, in denen die Proben bei -80°C gelagert wurden, variierte. Für zelluläre RNA gilt, dass Ribonukleinsäuren bei Raumtemperatur degradieren und deshalb ein zügiger Arbeitsablauf bei Kühlung auf Eis nötig ist. Dieses spricht grundsätzlich für ein Degradationsrisiko zellfreier Serum-RNA bei Raumtemperatur.

Es gibt jedoch auch Experimente über die Stabilität extrazellulärer RNA, in denen gezeigt wurde, dass diese mehrere Stunden nach der Blutentnahme stabil bleiben (Kopreski et al., 1999). Eine Arbeitsgruppe um Tsui empfiehlt die Verarbeitung extrazellulärer RNA innerhalb von 6 Stunden (Tsui et al., 2002), während El-Hefnawy die Stabilität in einem Zeitrahmen von 3 Stunden beobachtete (El-Hefnawy et al, 2004).

Als kritischer für die Integrität der RNA gilt das Einfrieren und Auftauen von Proben. In dieser Arbeit wurde die RNA in der Regel zweimal schockgefroren und aufgetaut: zunächst im Serum und dann als präparierte RNA. Dazwischen erfolgte die Lagerung bei -80°C . Kopreski konnte nachweisen, dass RNA bei mehr als zwei Frier-Tau-Zyklen degradiert wird (Kopreski et al., 1999). Außerdem wurde in dieser Studie gezeigt, dass RNA nur stabil bleibt, wenn nach dem ersten Auftauen die Präparation innerhalb von 15 Minuten erfolgt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied beobachtet werden zwischen dem RNA-Gehalt der Proben, die nach der Präparation sofort revers transkribiert und in der PCR analysiert wurden und denen, die vor der cDNA-Synthese erneut eingefroren wurden.

Als weitere denkbare Fehlerquelle wird eine Beeinflussung der Zytokinproduktion der Blutzellen nach der Blutentnahme durch koagulationsfördernde Zusätze in den Monovetten diskutiert (Gilbey et al., 2004). Da der Zeitraum von der Blutentnahme bis zur Zentrifugation des Serumröhrchens variierte, könnte auch dadurch eine veränderte RNA-Zusammensetzung im Serum vorgelegen haben.

4.6.3 RNA-Isolierung

Grundsätzlich bereitet die RNA-Isolation aus Plasma oder Serum mehr Schwierigkeiten als eine Präparation aus anderen Medien, da im Blut eine hohe Proteinkonzentration vorliegt (El-Hefnawy et al., 2004). Den Hauptanteil macht Albumin aus. Die Proteine verändern durch ihre Pufferkapazität den pH-Wert der zur Isolierung eingesetzten Puffer und erniedrigen dadurch die Effizienz der Aufarbeitung.

Die Probleme durch die verwendete Isolierungsmethode wurde bereits im Unterpunkt 4.3 diskutiert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Präparation der RNA mit RNeasy[®]

MIDI-Säulen, die eine Silikamembran enthalten. Ribonukleinsäuren absorbieren daran ab einer Länge von 200 Basenpaaren, wobei die Bindung bei größeren Molekülen effektiver ist. Dieses ist ein Nachteil bei der Isolierung von zirkulierender RNA, die laut Studien zumindest zum Teil fragmentiert vorliegt.

Vor der Aufarbeitung der Patientenproben wurden mehrere Isolierungsverfahren getestet. Kommerziell erhältliche Isolierungskits standen dabei im Vordergrund, um die Prozedur im Hinblick auf eine spätere klinische Routineanwendung so standardisiert wie möglich zu gestalten. Es wurde eine Serumprobe mit einer definierten Menge mRNA versetzt, aliquotiert und parallel mit verschiedenen Methoden präpariert. Anschließend erfolgte nach einer cDNA-Synthese die Auswertung durch eine quantitative GAPDH-Bestimmung. Das RNeasy[®] MIDI-Kit lieferte dabei die konstantesten Ergebnisse. Die Ausbeute an Gesamt-RNA wurde bei diesen Vergleichen jedoch ebenso wenig berücksichtigt wie die isolierten Hoj-1, Ki-67 oder Rad51-Kopien.

Bei einem Vergleich verschiedener Isolierungsmethoden kam El-Hefnawy zu dem Schluss, dass die gebräuchlichen Membranen aus Silika oder Cellulose nur eine ineffektive Isolation fragmentierter Serum-RNA zulassen. Die größte RNA-Ausbeute wurde in dieser Studie mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen (El-Hefnawy et al., 2004).

Die Methode mit aktivierter Silika beruht ebenso wie die Phenol-Chloroform-Extraktion auf dem Prinzip der Präzipitation. Damit sind nach den vorliegenden Ergebnissen deutlich größere Ausbeuten möglich.

4.6.4 cDNA-Synthese

Die Reverse Transkription gilt im Vergleich zur PCR als Reaktion mit einer hohen Fehlerwahrscheinlichkeit. Einfluss auf die Ausbeute der cDNA-Synthese haben Sekundär- und Tertiärstrukturen der mRNA, Variationen in der Effizienz der Primer sowie mögliche Inhibitoren in biologischen Proben.

In dieser Arbeit erfolgte die Reverse Transkription mit zufälligen hexamer Primern. Als Alternativen würden oligo(dT)-Primer und Gen-spezifische Primer in Betracht kommen. Studien über die Effizienz der Reversen Transkription ergaben, dass keine Primingstrategie für alle Gene die besten Ergebnisse bringt, sondern dass bei unterschiedlichen cDNA-Spezies auch andere Primer effizienter sein können (Stahlberg et al., 2004).

Für diese Arbeit sollte jedoch eine einheitliche Primingmethode verwendet werden, da die RNA-Eluate einer RNeasy[®]-Säule komplett in die Reverse Transkription eingingen und erst nach diesem Schritt für die PCR mit spezifischen Primern aliquotiert wurden. Für eine

Teilung der Proben vor der cDNA-Synthese genügte das Ausgangsmaterial nicht. Die Verwendung Gen-spezifischer Primer wäre somit nicht möglich gewesen. Gegen die Verwendung mRNA-spezifischer Oligo(dT)-Primer sprach, dass die in der PCR amplifizierten Sequenzen jeweils an verschiedenen Positionen der mRNA liegen. Je weiter am 5'-Ende die Sequenz liegt, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine erfolgreiche Reverse Transkription der gesuchten Sequenz stattfindet. Somit wurden die Versuche mit Hexamer Primern durchgeführt.

4.6.5 PCR

Bei der quantitativen PCR wurde ein TaqMan-System verwendet. Diese Methode erwies sich in Vorversuchen als sensitiver als Amplifikationen mit SYBR Green (siehe 2.4.11) oder mit LUX™ Primern der Firma Invitrogen, bei denen einer der beiden Primer den fluoreszierenden Farbstoff trägt. Eine Steigerung der Ertragsmenge könnte aber möglicherweise mit einer verlängerten Elongationszeit erreicht werden, da die Länge der amplifizierten Sequenzen bei Ki-67 und Rad51 über 200bp beträgt.

Außerdem wurden bei der quantitativen PCR jeweils die cDNA-Proben aus dem Serum mit Standards bekannter Kopienzahl verglichen. Als Standards wurden linearisierte Plasmide verwendet, in denen die entsprechende Sequenz als Insert enthalten ist. Diese als Matrix für die Amplifikation verwendete Sequenz wurde ursprünglich aus zellulärer RNA gewonnen. Bislang ist nicht genug über zirkulierende Nukleinsäuren bekannt, um einen Vergleich zwischen Standards aus Plasmid-DNA und Proben mit extrazellulärer cDNA als mögliche Fehlerquelle auszuschließen.

4.6.6 Auswertung

Der überwiegende Anteil der Patientenproben stammte von Frauen mit einem östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom ohne lymphogene Metastasierung (23 von 36 Proben = 63,9%). Nach den bislang bekannten Prognosefaktoren, die auch in dieser Arbeit zur Auswertung verwendet wurden, gelten diese Tumoren als prognostisch günstig. Es sind jedoch auch bei diesen Tumoren progrediente Verläufe bekannt, ohne dass diese bislang vorausgesagt werden konnten. Einer Arbeitsgruppe gelang es, anhand der Expression von 21 Genen im Tumorgewebe östrogenrezeptorpositive Mammakarzinome ohne lymphogene Metastasierung in drei Kategorien mit niedriger, mittlerer und hoher Rezidivwahrscheinlichkeit einzuteilen. Eine Analyse nach zehn Jahren Beobachtungszeit ergab, dass die Rezidivrate in der Gruppe mit dem niedrigen Risiko signifikant geringer war als in der Hochrisikogruppe (Paik et al., 2004). In diesem Assay wurde unter anderem

ki-67 verwendet. Dementsprechend könnten die verwendeten Prognosefaktoren für das vorliegende Patientenkollektiv nicht aussagekräftig genug sein. Sinnvoller wäre eine Nachbeobachtung der eingeschlossenen Patientinnen über einen geeigneten Zeitraum, um anhand der Überlebensraten und der Rezidivhäufigkeit zu überprüfen, ob einer der untersuchten Marker im Serum mit der Prognose korreliert.

Außerdem ist eine Normierung für zirkulierende RNA im Serum nötig. Eine Möglichkeit wäre hierfür die Gesamt-RNA oder eventuell auch ribosomale RNA, die extrazellulär detektierbar ist und weniger Variationen in der Expression zeigt als beispielsweise GAPDH. Ein Problem stellt dabei die geringe Menge an messbarer Serum-RNA dar. Bei der verwendeten Methode kann jeweils ein ml Serum aufgearbeitet werden, der durchschnittlich 1-10 ng Gesamt-RNA enthält (El-Hefnawy et al., 2004). Daher sollte das Eluat für ausreichend genaue Detektionen komplett in der PCR eingesetzt werden, zumal wegen der Doppelbestimmungen eine weitere Aliquotierung nötig ist. Eine gesonderte Konzentrationsbestimmung ist somit schwer realisierbar, während die Normierung auf eine spezifische cDNA, die ebenfalls durch die PCR detektiert werden kann, praktikabel ist.

Allerdings erscheint es zum heutigen Zeitpunkt fraglich, ob überhaupt eine bestimmte RNA-Spezies im Serum mit der Gesamt-RNA korreliert und somit als Normierung verwendet werden könnte. So bestimmte eine Arbeitsgruppe im Serum sowohl die Konzentrationen von Gesamt-RNA in einem Fluoreszenz-basierten Assay mit SYBR Green II als auch die Kopienzahlen bestimmter cDNA-Spezies mit PCR. Bislang konnte bei keiner spezifischen Ribonukleinsäure wie beispielsweise ribosomaler RNA oder GAPDH eine Korrelation zur Gesamt-RNA gesehen werden.

4.6.7 Biologische Ursachen

Für zirkulierende DNA wurde nachgewiesen, dass die Konzentrationen im Plasma bei Frauen zyklusabhängig variieren und während der Menstruation am höchsten sind (Jahr, 2001a). Dieses ist auch für RNA denkbar und könnte eine Störquelle darstellen.

Zudem konnte in einer Arbeit mit gesunden Versuchspersonen gezeigt werden, dass im Plasma von Männern durchschnittlich 3,5x mehr zirkulierende RNA detektiert werden kann als im Plasma gesunder Frauen, während die durchschnittliche Konzentration zirkulierender DNA bei beiden Geschlechtern gleich ist (Tamkovich et al., 2005).

In der Literatur werden außerdem Pseudogene als eine Quelle für eventuelle falsch-positive Resultate diskutiert (Gilbey et al., 2004).

4.7 Vor- und Nachteile von RNA-Markern gegenüber DNA bei der klinischen Anwendung

Ein bedeutsamer Nachteil von RNA liegt in einer größeren Empfindlichkeit als DNA. Während DNA auch bei Raumtemperatur stabil bleibt, ist für die Aufbewahrung von RNA mindestens -20°C erforderlich. Durch ubiquitär vorhandene RNasen ist zudem eine besonders sterile Arbeitsweise erforderlich. Dieses kann als Hindernis für eine Routineanwendung betrachtet werden.

Dennoch bietet RNA viele Vorteile gegenüber DNA. So ist die Detektion nicht auf das Vorhandensein von Mutationen angewiesen, woraus sich ein deutlich breiteres Anwendungsspektrum ergibt. Vor allem für ein serologisches Tumorscreening wäre ein geeigneter RNA-Marker sensitiver als eine DNA-Detektion. Auch werden Proliferationsfaktoren und weitere oft Tumor-assoziierte Proteine in der Regel nicht in Leukozyten synthetisiert, wie in dieser Arbeit anhand von der Transkription von drei mRNA-Spezies gezeigt werden konnte. Dadurch werden falsch-positive Ergebnisse durch rupturierte Blutzellen vermieden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei sauberer Handhabung die Vorteile einer RNA-Analyse im Serum gegenüber anderen Methoden überwiegen.

5 Zusammenfassung

Seit im Blut von Krebspatienten tumorspezifische Nukleinsäuren nachgewiesen wurden, wird die Detektion von zirkulierender RNA in Körperflüssigkeiten als viel versprechende Möglichkeit zur Malignomdiagnostik diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden zur Isolation und Quantifizierung von Serum-RNA entwickelt. Damit wurden potentielle neue Tumormarker auf ihre Eignung zur Brustkrebsdiagnostik überprüft. Zudem wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen spezifischen freien Nukleinsäuren im Serum und Prognosefaktoren des Tumors besteht.

Drei mögliche mRNA-Tumormarker für das Mammakarzinom wurden untersucht: Ki-67 und Rad51, deren Expression im Tumorgewebe bekannt ist, sowie Hoj-1 als bislang unbekannter Marker. Als interner Standard diente GAPDH.

Zunächst erfolgten Zellkulturversuche. Dabei wurde RNA aus zehn verschiedenen Tumor- und Primärzelllinien revers transkribiert und in konventioneller und quantitativer PCR auf die Expression dieser mRNA-Spezies überprüft. Die deutlichsten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien zeigten sich bei der Hoj-1-Detektion. Von den Tumorzellen wies die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 sowohl als Absolutwert als auch auf das *housekeeping*-Gen GAPDH bezogen die höchste Hoj-1-Expression auf.

In der RNA aus Leukozyten konnte der interne Standard GAPDH detektiert werden, nicht aber die drei potentiellen Tumormarker. Dadurch wurde das Risiko falsch-positiver Ergebnisse der Serumuntersuchungen durch Kontaminationen aus rupturierten Blutzellen ausgeschlossen.

Im Anschluss an die Zellkultur- und Blutzellexperimente erfolgte die RNA-Isolierung aus Serumproben von 36 Patientinnen mit duktal-invasivem Mammakarzinom und 19 gesunden Frauen. In allen Proben konnte der interne Standard GAPDH nachgewiesen werden. Die Kopienzahlen lagen mit durchschnittlich $8,9 \times 10^3/\text{ml}$ bei Brustkrebspatientinnen und $4,3 \times 10^3/\text{ml}$ bei gesunden Frauen im gleichen Bereich.

Hoj-1-, Rad51- und Ki-67-RNA konnten jeweils nur in einigen Proben nachgewiesen werden. Dabei bestand weder eine Korrelation zur Tumorerkrankung noch zu anderen klinisch-pathologischen Parametern. Rückschlüsse von mRNA-Expressionen im Tumorgewebe oder in Zellkulturen auf die Nukleinsäurezusammensetzung im Serum sind nach diesen Ergebnissen nicht zulässig. Es ergaben sich jedoch Hinweise darauf, dass Hoj-1 Serum-RNA dennoch ein Potential als Tumormarker hat.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Ahr A, Karn T, Solbach C, Seiter T, Strebhardt K, Holtrich U, Kaufmann M: Identification of high risk breast-cancer patients by gene expression profiling. *Lancet* 359, 131-132 (2002)
- 2) Ashworth TR: A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 14, 146-147 (1869)
- 3) Assersohn L, Gangi L, Thao Y, Dowsett M, Simon R, Powles TJ, Liu ET: The feasibility of using fine needle aspiration from primary breast cancers for cDNA Microarray analyses. *Clin Cancer Res* 8, 794-801 (2002)
- 4) Barroso I, Benito B, Garcia-Jimenez C, Hernandez A, Obregon MJ, Santisteban P: Norepinephrine, tri-iodothyronine and insulin upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA during brown adipocyte differentiation. *Eur J Endocrinol* 141, 169-179 (1999)
- 5) Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa J-P: Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72, 141-196 (1998)
- 6) Bazanova NV, Seits IF: Can the presence of an RNA-lipoprotein complex in human blood serum give evidence of a cancerous disease? *Eksp Onkol* 11(2), 37-39 (1989)
- 7) Bennett RM, Gabor GT, Merritt MM: DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA. *J Clin Invest* 76, 2182-2190 (1985)
- 8) Biggiogera M, Bottone MG, Pellicciari C: Nuclear RNA is extruded from apoptotic cells. *J Histochem Cytochem* 46(9), 999-1005 (1998)
- 9) Bloom HJG, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11(3), 359-377 (1957)
- 10) Bosma AJ, Weigelt B, Lambrechts AC, Verhagen OJHM, Pruntel R, Hart AAM, Rodenhuis S, Van't Veer LJ: Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes. *Clin Cancer Res* 8, 1871-1877 (2002)
- 11) Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193 (2000)
- 12) Carmeliet P, Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257 (2000)

- 13) Carrel A: On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med* 15, 516-528 (1912)
- 14) Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Lyautey J, Lederrey C, Faltin-Traub E, Stroun M, Anker P: Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 5, 2297-2303 (1999)
- 15) Chen X, Bonnefoi H, Pelte M-F, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P, Stroun M, Anker P: Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6, 3823-3826 (2000)
- 16) Cheung KL, Graves CRL, Robertson JFR: Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. *Cancer Treat Rev* 26(2), 91-102 (2000)
- 17) Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LWMM, Hayes DF: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351(8), 781-791 (2004)
- 18) Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N: The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59, 483-489 (1994)
- 19) Dasi F, Lledo S, Garcia-Granero E, Ripoll R, Marugan M, Tormo M, Garcia-Conde J, Alino SF: Real-time quantification in plasma of human telomerase Reverse transkriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest* 81(5), 767-769 (2001)
- 20) Debeer P, Schoenmakers EFPM, Thoelen R, Holvoet M, Kuittinen T, Fabry G, Fryns J-P, Goodman FR, Van de Ven WJM: Physical map of a 1,5Mb region on 12p11.2 harbouring a synpolydactyly associated chromosomal breakpoint. *Eur J Hum Genet* 8, 561-570 (2000)
- 21) Debeer P, Schoenmakers EFPM, Twal WO, Argraves WS, De Smet L, Fryns J-P, Van de Ven WJM: The fibulin-1 gene (FBLN1) is disrupted in a t(12;22) associated with a complex type of synpolydactyly. *J Med Genet* 39, 98-104 (2002)
- 22) Desprez PY, Poujol D, Saez S: Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: B-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃). *Cancer Lett* 64, 219-224 (1992)
- 23) Duffy MJ: CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer. *Ann Clin Biochem* 36, 579-586 (1999)

- 24) Duffy MJ: Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin Chem* 52(3), 345-351 (2006)
- 25) El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM, Luketich JD, Godfrey TE: Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem* 50(3), 564-573 (2004)
- 26) Fabisiewicz A, Kulik J, Kober P, Brewczynska E, Pienkowski T, Siedlecki JA: Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by two-marker Reverse transkriptase-polymerase chain reaction assay. *Acta Biochim Pol* 51(3), 747-755 (2004)
- 27) Fidler IJ: Critical factors in the biology of human cancer metastasis: Twenty-eight G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 50, 6130-6138 (1990)
- 28) Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82, 4-6 (1990)
- 29) Folkman J, Haudenschild C: Angiogenesis *in vitro*. *Nature* 288, 551-556 (1980)
- 30) Gal S, Fidler C, Lo YMD, Taylor M, Han C, Moore J, Harris AL, Wainscoat JS: Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *Br J Cancer* 90, 1211-1215 (2004)
- 31) Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO: The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 22, 207-219 (1992)
- 32) Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC, Ontanon J, Martinez E: Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis". *Blood* 95(2), 724-725 (2000)
- 33) Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC, Ontanon J, Martinez E, Vallejo M: Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis. *Histol Histopathol* 14(4), 1159-1164 (1999)
- 34) Garcia-Olmo DC, Gutiérrez-González L, Ruiz-Piqueras R, Picazo MG, Garcia-Olmo D: Detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma during tumor progression in rats. *Cancer Lett* 217, 115-123 (2005)
- 35) Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Holen I: The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol* 57, 903-911 (2004)
- 36) Goessl C: Noninvasive molecular detection of cancer – the bench and the bedside. *Curr Med Chem* 10, 691-706 (2003)
- 37) Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O: Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and non-invasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* 295(1), 17-21 (2001)

- 38) Graven KK, Troxler RF, Kornfeld H, Panchenko MV, Farber HW: Regulation of endothelial cell glyceraldehydaldehyd-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *J Biol Chem* 269(39), 24446-24453 (1994)
- 39) Grünewald K, Haun M, Urbanek M, Fiegl M, Müller-Holzner E, Gunsilius E, Dünser M, Marth C, Gastl G: Mammaglobin gene expression: A superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19. *Lab Invest* 80(7), 1071-1077 (2000)
- 40) Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z: Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 260, 248-256 (2000)
- 41) Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000)
- 42) Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U: Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 47, 1488-1489 (2001)
- 43) Hernandez-Alcoceba R, del Peso L, Lacal JC: The ras family of GTPases in cancer cell invasion. *Cell Mol Life Sci* 57(1), 65-76 (2000)
- 44) Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI: Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 93(11), 3956-3963 (1999)
- 45) Jahr S.: DNA-Fragmente im Plasma von Tumorpatienten. *Nat. Diss. Konstanz* (2001a)
- 46) Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch R-D, Knippers R: DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61, 1659-1655 (2001b)
- 47) Jonat W, Maass H, Stegner HE: Immunohistochemical measurement of estrogen receptors in breast cancer tissue samples. *Cancer Res* 46, 4296s-4298s (1986)
- 48) Kamm RC, Smith AG: Ribonuclease activity in human plasma. *Clin Biochem* 5, 198-200 (1972)
- 49) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015 (1994)
- 50) Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD: Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 5, 1961-1965 (1999)

- 51) Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Sumarokov SV, Kolomiets SA, Sevostianova NV, Vlassov VV: Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23 (6&7), 879-883 (2004)
- 52) Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649 (1998)
- 53) Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37, 646-650 (1977)
- 54) Levine AJ: P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331 (1997)
- 55) Liggett WH Jr, Sidransky D: Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 16(3), 1197-1206 (1998)
- 56) Loeb LA: Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51, 3075-3079 (1991)
- 57) Loeb LA: A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61, 3230-3239 (2001)
- 58) Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP: Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(3), 776-781 (2003)
- 59) Maacke H, Opitz S, Jost K, Hamdorf W, Henning W, Krüger S, Feller AC, Lopens A, Diedrich K, Schwinger E, Stürzbecher H-W: Over-expression of wild type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer* 88, 907-913 (2000)
- 60) Mandel P, Metais P : Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Acad Sci Paris* 142, 241-243 (1948)
- 61) Mayall F, Fairweather S, Wilkins R, Chang B, Nicholls R : Microsatellite abnormalities in plasma of patients with breast carcinoma : concordance with the primary tumour. *J Clin Pathol* 52, 363-366 (1999)
- 62) Mehes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF: Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol* 159(1), 17-20 (2001)
- 63) Menke TB, Boettcher K, Krüger S, Kausch I, Boehle A, Sczakiel G, Warnecke JM: Ki-67 protein concentrations in urothelial bladder carcinomas are related to Ki-67-specific RNA concentrations in urine. *Clin Chem* 50(8), 1461-1463 (2004)
- 64) Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer

- D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rosteck P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick MH: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71 (1994)
- 65) Morozkin ES, Laktionov PP, Rykova EY, Vlassov VV: Fluorometric quantification of RNA and DNA in solutions containing both nucleic acids. *Anal Biochem* 322, 48-50 (2003)
- 66) Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, Lo ES, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YM: Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 48(8), 1212-1217 (2002)
- 67) Ni H, Capodici J, Cannon G, Communi D, Boeynaems J-M, Karikó K, Weissman D: Extracellular mRNA induces dendritic cell activation by stimulating tumor necrosis factor- α secretion and signalling through a nucleotide receptor. *J Biol Chem* 277(15), 12689-12696 (2002)
- 68) Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28 (1976)
- 69) Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N: A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351(27), 2817-2826 (2004)
- 70) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Borresen-Dale A-L, Brown PO, Botstein D: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752 (2000)
- 71) Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma V-M, Syrjänen K: The important prognostic value of Ki-67 expression as determined by image analysis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 122, 687-692 (1996)
- 72) Pool EH, Dunlop GR: Cancer cells in the blood stream. *Am J Cancer* 21, 99-103 (1934)
- 73) Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR: A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33, 49-54 (2003)
- 74) Revillion F, Pawlowski V, Hornez L, Peyrat J-P: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* 36, 1038-1042

(2000)

75) Rolland V, Dugail I, Le Liepvre X, Lavau M: Evidence of increased glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthetase promoter activities in transiently transfected adipocytes from genetically obese rats. *J Biol Chem* 270(3), 1102-1106 (1995)

76) Ross JS, Fletcher JA: The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 16, 413-428 (1998)

77) Schmutte C, Tomblin G, Rhiem K, Sadoff MM, Schmutzler R, von Deimling A, Fishel R: Characterization of the human Rad51 genomic locus and examination of tumors with 15q14-15 loss of heterozygosity (LOH). *Cancer Res* 59, 4564-4569 (1999)

78) Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley R, Livingston DM: Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265-275 (1997)

79) Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA: Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 51, 2116-2120 (1983)

80) Shaw JA, Smith BM, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ, Walker RA, Coombes RC: Microsatellite alterations in plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6, 1119-1124 (2000)

81) Shay JW, Bacchetti S: A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33(5), 787-791 (1997)

82) Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Gonzalez R, Villanueva MJ, Navarro F, Provencio M, San Martin S, Espana P, Bonilla F: Presence of tumor DNA in Plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res* 59, 3251-3256 (1999a)

83) Silva JM, Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Sanchez A, Rodriguez O, Provencio M, Espana P, Bonilla F: Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 7, 2821-2825 (2001)

84) Silva JM, Dominguez G, Villanueva MJ, Gonzalez R, Garcia JM, Corbacho C, Provencio M, Espana P, Bonilla F: Aberrant DNA methylation of the p16^{INK4a} gene in plasma DNA of breast cancer patients. *Br J Cancer* 80(8), 1262-1264 (1999b)

85) Silva JM, Gonzalez R, Dominguez G, Garcia JM, Espana P, Bonilla F: TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 24(2), 160-161 (1999c)

- 86) Silva J, Silva JM, Garcia V, Garcia JM, Dominguez G, Bonilla F: RNA is more sensitive than DNA in identification of breast cancer patients bearing tumor nucleic acids in plasma. *Genes Chromosomes Cancer* 35, 375-376 (2002a)
- 87) Silva JM, Silva J, Sanchez A, Garcia JM, Dominguez G, Provencio M, Sanfrutos L, Jareño E, Colas A, Espana P, Bonilla F: Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clin Cancer Res* 8, 3761-3766 (2002b)
- 88) Sisco KL: Is RNA in serum bound to nucleoprotein complexes? *Clin Chem* 47(9), 1744-1745 (2001)
- 89) Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Vlassov VV, Laktionov PP: Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br J Cancer* 94(10), 1492-1495 (2006)
- 90) Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE: Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of Reverse transkriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 338, 1227-1229 (1991)
- 91) Sorensen GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL: Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3(1), 67-71 (1994)
- 92) Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale A-L: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(19), 10869-10874 (2001)
- 93) Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M: Properties of the Reverse transkription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem* 50(3), 509-515 (2004)
- 94) Taback B, Chan AD, Kuo CT, Bostick PJ, Wang H-J, Giuliano AE, Hoon DSB: Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multimolecular marker assay: correlation with clinical stage of disease. *Cancer Res* 61, 8845-8850 (2001)
- 95) Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Rykova EY, Permyakova VI, Vlassov VV, Laktionov PP: Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors. *Clin Chem* 51(7), 1317-1319 (2005)
- 96) Tamkovich SN, Laktionov PP, Rykova EY, Vlassov VV: Simple and rapid

procedure suitable for quantitative isolation of low and high molecular weight extracellular nucleic acids. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23(6-7), 873-877 (2004)

97) Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD: Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 48(10), 1647-1653 (2002)

98) Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347(25), 1999-2009 (2002)

99) Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536 (2002)

100) Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M: Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 86(4), 774-779 (1994)

101) Vispe S, Cazaux C, Lesca C, Defais M: Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* 26 (12), 2859-2864 (1998)

102) Wasserman L, Dreilinger A, Easter D, Wallace A: A seminested RT-PCR assay for HER2/neu: Initial Validation of a new method for the detection of disseminated breast cancer cells. *Mol Diagn* 4(1), 21-28 (1999)

103) Watson MA, Dintzis A, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, Fleming TP: Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res* 59, 3028-3031 (1999)

104) Watson MA, Fleming TP: Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res* 56, 860-865 (1996)

105) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324(1), 1-8 (1991)

106) Weigelt B, Bosma A, Hart AAM, Rodenhuis S, Van't Veer LJ: Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 88, 1091-1094 (2003)

107) Wiczorek AJ, Rhyner C, Block LH: Isolation and characterization of an RNA-

proteolipid complex associated with the malignant state in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3455-3459 (1985)

108) Wong IH, Yeo W, Chan AT, Johnson PJ: Quantitative correlation of cytokeratin 19 mRNA level in peripheral blood with disease stage and metastasis in breast cancer patients: potential prognostic implications. *Int J Oncol* 18(2), 633-638 (2001)

109) Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G, Barfoot R, Hamoudi R, Patel S, Rice C, Biggs P, Hashim Y, Smith A, Connor F, Arason A, Gudmundsson J, Ficenec D, Kelsell D, Ford D, Tonin P, Bishop DT, Spurr NK, Ponder BAJ, Eeles R, Peto J, Devilee P, Cornelisse C, Lynch H, Narod S, Lenoir G, Egilsson V, Barkadottir RB, Easton DF, Bentley DR, Futreal PA, Ashworth A, Stratton MR: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789-792 (1995)

110) Wulf GG, Jürgens B, Liersch T, Gatzemeier W, Rauschecker H, Buske C, Hüfner M, Hiddemann W, Wörmann B: Reverse transkriptase / polymerase chain reaction analysis of parathyroid hormone-related protein for the detection of tumor cell dissemination in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 123, 514-521 (1997)

111) Yamada H, Chen D, Monstein H-J, Hakanson R: Effects of fasting on the expression of gastrin, cholecystokinin, and somatostatin genes and of various housekeeping genes in the pancreas and upper digestive tract of rats. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 835-838 (1997)

112) Yanagisawa T, Urade M, Yamamoto Y, Furuyama J: Increased expression of human DNA repair genes, XRCC1, XRCC3 and Rad51, in radioresistant human KB carcinoma cell line N10. *Oral Oncol* 34, 524-528 (1998)

113) Yokota J: Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21(3), 497-503 (2000)

114) Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-347 (1991)

115) Zhang S, Hunter DJ, Forman MR, Rosner BA, Speizer FE, Colditz GA, Manson JE, Hankinson SE, Willett WC: Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91(6), 547-556 (1999)

116) Zhong H, Simons JW: Direct comparison of GAPDH, β -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 523-526 (1999)

7 Anhänge

7.1 Erklärung über die Genehmigung der Untersuchungen von der Ethikkommission

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden in der Sitzung der Ethikkommission am 14. Januar 2003 unter dem Aktenzeichen 02-140 genehmigt. Antragsteller waren Herr Dr. Kolberg und Herr Prof. Diedrich der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, der Titel des Antrages lautete „RAMA: RNA-Analyse bei Mammacarcinom“.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

AMP	Ampicillin
APS	Ammonium-Peroxodisulfat
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
β-HCG	β-UE des humanen Choriongonadotropin
BRCA	Breast Cancer Gene
°C	Grad Celsius
CA 15-3	Carcinom-Antigen 15-3
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CEA	carcinoembryonales Antigen
CK-19	Cytokeratin 19
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
c12orf2	homo sapiens chromosom 12 open reading frame 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EGF-R	epidermal-growth-factor receptor
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ER	Östrogen
FKS	fetales Kälberserum
f	femto (10 ⁻¹⁵)
fwd	Forward
g	Gramm

GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HER	Human Epidermal growth factor Receptor
hMAM	humanes Mammaglobin
hTERT	Telomerase Reverse Transkriptase Protein
hTR	Telomerase RNA Template
kb	Kilobase = 1000 Basenpaare
l	Liter
LB	Luria Broth (ein Bakterienmedium)
li	links
m	milli (10^{-3}); Meter
M	Molar
Mb	Megabase = 1 000 000 Basenpaare
min	Minute
MNC	Leukozyten
MUC1	Epitheltypisches Muzin
non-RT	non-RT-Kontrolle (siehe 2.2.7)
Nr	Nummer
NTC	non Template Kontrolle
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PR	Progesteron
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
pH	pondus Hydrogenii
PTHrP	Parathyroid-hormone-related protein
re	rechts
rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase

SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPA	Gewebe-Polypeptid Antigen
TPS	Gewebe-Polypeptid spezifisches Antigen
U	Unit
UE	Untereinheit
UICC	Union International Contre Cancer
UV	Ultraviolett
V	Volt
x	mal
xg	mal Erdbeschleunigung (gravity)

7.3 Quantitative PCR-Ergebnisse der einzelnen Serumproben

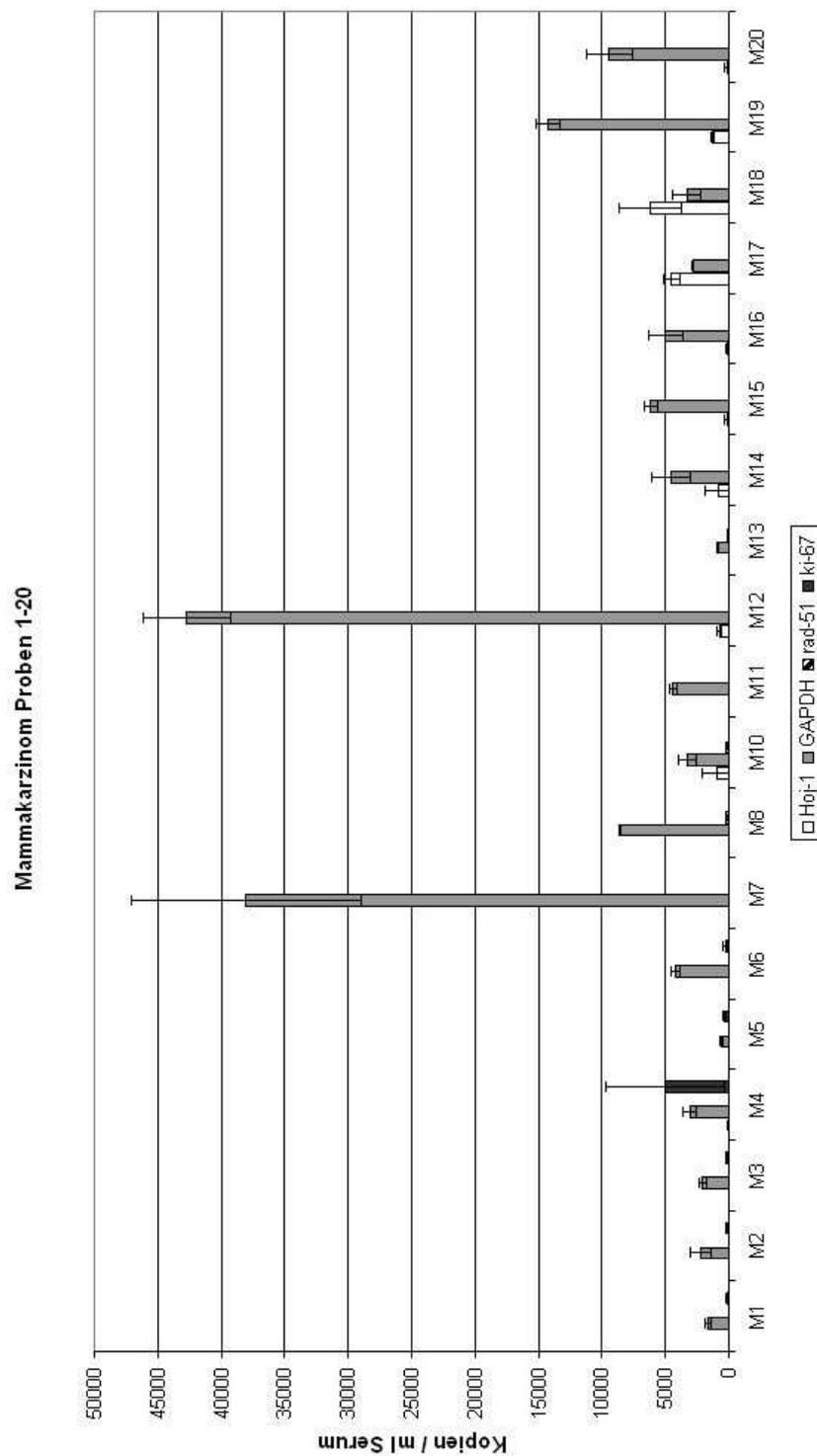


Abbildung 29: Diagramm mit den Ergebnissen für Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 der Proben M1-M20.

M9 wurde nicht berücksichtigt, da sich der Tumor nicht als Mammakarzinom erwies.

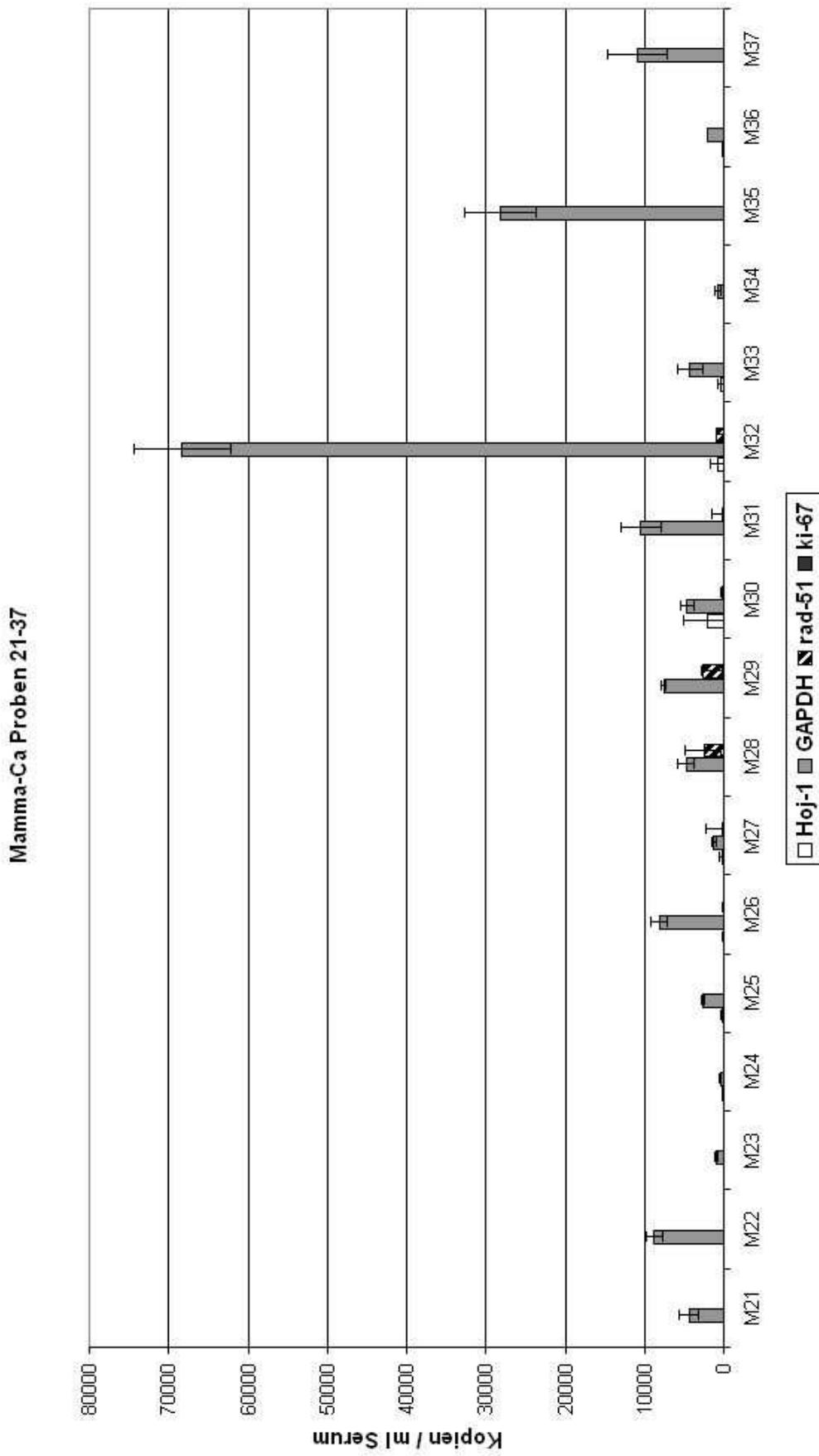


Abbildung 30: Ergebnisse der qPCR der Proben M21-M36

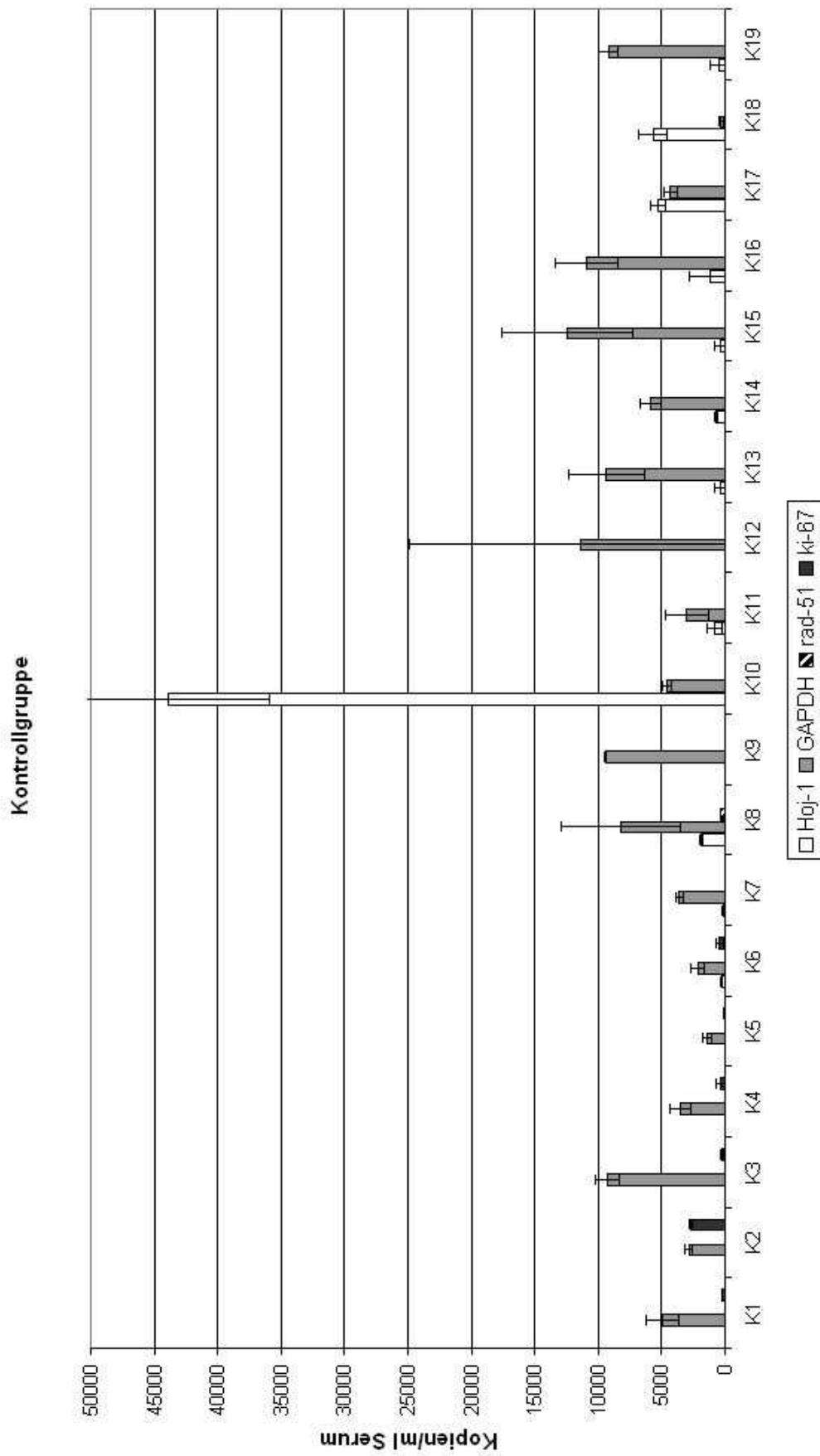


Abbildung 31: Ergebnisse der Detektionen aus Serum-cDNA der Kontrollgruppe

7.4 In der Auswertung verwendete Daten der Mammakarzinompatientinnen

Nr.	Geburtsjahr	Her2-neu-Status	Östrogen-Rezeptorstatus	Progesteron-Rezeptorstatus	Tumorgroße nach UICC 2002	Lymphknotenstatus	Grading nach Elston & Ellis	Nottingham Prognosescore
M1	1939	3+	12	3	2	0	2	2
M2	1956	re 2+ / li 1+	beidseits 12	beidseits 12	re 1c / li 1a	beidseits 0	re 3 / li 2	2
M3	unbekannt	1+	12	12	1c	0	2	2
M4	1936	2+	12	12	2	0	2	2
M5	1942	3+	1	12	1c	0	3	2
M6	1942	1+	12	12	1c	0	2	2
M7	1947	2+	12	12	3m	0	2	2
M8	1940	2+	12	12	2	0	2	2
M10	1964	3+	12	12	2	0	2	2
M11	1945	0	4	4	2	0	3	2
M12	1930	3+	12	3	2	1a (1/16)	3	3
M13	1930	1+	0	0	1c	0	3	2
M14	1922	1+	6	6	3	0	2	2
M15	1955	0	12	6	2	2a (4/20)	3	3
M16	1957	3+	9	12	2	0	2	2
M17	1939	0	12	4	1b	0	2	1
M18	1957	3+	0	0	2	0	2	2
M19	1959	2+	0	0	3	1a (1/18)	3	3
M20	1959	0	12	12	2	1a (1/17)	2	2

Tabelle 7: Daten der Patientinnen M1-M20.

Fernmetastasen lagen bei keiner Patientin vor. Bei Patientin M2 wurde beidseits ein Mammakarzinom diagnostiziert.

Nummer	Geburtsjahr	Her2-neu-Status	Östrogen-Rezeptorstatus	Progesteron-Rezeptorstatus	Tumorgroße nach UICC 2002	Lymphknotenstatus	Grading nach Elston & Ellis	Nottingham Prognosescore
M21	1947	1+	0	0	2	1 (3/10)	3	3
M22	1945	1+	12	12	1c	0	2	2
M23	1944	1+	12	12	1c	0	2	2
M24	1953	1+	0	0	2	1a (1/25)	3	3
M25	1940	1+	12	12	1c	0	2	2
M26	1955	1+	5	12	1c	0	2	2
M27	1943	3+	9	6	1c	0	3	2
M28	1961	2+	9	12	2	1a (1/20)	2	2
M29	1967	3+	12	12	1c	0	2	2
M30	1960	1+	12	12	3	0	2	2
M31	1938	2+	12	12	4b	0	2	2
M32	1962	3+	0	0	1c	0	2	2
M33	1933	2+	12	12	2	1a (2/24)	2	2
M34	1931	3+	12	6	2	0	2	2
M35	1941	3+	9	0	2	1a (1/17)	2	2
M36	1961	1+	12	9	2	0	2	2
M37	1945	3+	12	12	1c	1a (2/10)	2	2

Tabelle 8: Daten der Patientinnen M21 bis M37

Fernmetastasen lagen bei keiner Patientin vor.

7.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Splicevarianten von Hoj-1	12
Abbildung 2: Schema der photometrischen Konzentrationsbestimmung	23
Abbildung 3: PCR mit MCF-7-cDNA und drei unterschiedlichen Hoj-1-Primerpaaren, auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt ...	46
Abbildung 4: Amplifikationskurven der Standards von 10^7 Kopien bis 10^1 Kopie mit dem Primerpaar Hoj-fwd/Hoj-rev	48
Abbildung 5: Standardkurve der Standards von 10^1 Kopie bis 10^7 Kopien mit dem Primerpaar Hoj-fwd/Hoj-rev	48
Abbildung 6: Nachweis von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 durch PCR in MDA- MB-231-cDNA	49
Abbildung 7: Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in MCF-7 cDNA	49
Abbildung 8: Nachweis der vier RNA-Spezies in HeLa cDNA	50
Abbildung 9: Hec-1A cDNA mit Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51	50
Abbildung 10: qualitativer Nachweis von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in LNCAP	51
Abbildung 11: Detektion von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in ECV-304 cDNA	51
Abbildung 12: PCR mit HEP-G2 cDNA und vier verschiedenen Primerpaaren	52
Abbildung 13: Nachweis von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in JURKAT cDNA	52
Abbildung 14: Detektion von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in BJAB cDNA	53
Abbildung 15: Fibroblasten cDNA mit Primern von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 ..	53
Abbildung 16: GAPDH-Kopien in der cDNA aus 12ng RNA verschiedener Zelllinien	Fehler! Textmarke
Abbildung 17: Kopienzahlen von Hoj-1, Rad51 und Ki-67 in der cDNA aus 12ng RNA ohne Normierung	55
Abbildung 18: Kopienzahlen von Hoj-1, Rad51 und Ki-67 in den verschiedenen Zelllinien nach der Normierung auf die GAPDH-Expression	56
Abbildung 19: Detektion mit cDNA aus männlichen Leukozyten	58
Abbildung 20: PCR mit cDNA aus weiblichen Leukozyten	58
Abbildung 21: Kopienzahlen von Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 in der cDNA von 12ng total-RNA aus Leukozyten	59
Abbildung 22: Boxplot-Darstellung der gemessenen GAPDH-RNA-Kopien pro ml Serum	60
Abbildung 23: Boxplot-Darstellung der gemessenen Kopienzahlen für Ki-67 RNA in der Patienten- und der Kontrollgruppe	62

Abbildung 24: Rad51-Kopien pro ml Serum bei der Kontroll- und der Patientengruppe, dargestellt als Boxplot	63
Abbildung 25: Boxplot der Hoj-1-RNA-Kopien pro ml Serum bei der Kontroll- und der Patientengruppe	65
Abbildung 26: Boxplot-Darstellung der Ki-67-Kopien / ml Serum bei hormonrezeptor-positiven bzw. negativen Tumoren	66
Abbildung 27: Rad51-Kopien im Serum, dargestellt nach dem Östrogen- und Progesteronrezeptor-status	67
Abbildung 28: Hoj-1 Kopien im Serum von Patientinnen mit Hormonabhängigem oder –unabhängigem Mammakarzinom	67
Abbildung 29: Diagramm mit den Ergebnissen für Hoj-1, GAPDH, Ki-67 und Rad51 der Proben M1-M20	96
Abbildung 30: Ergebnisse der qPCR der Proben M21-M36	97
Abbildung 31: Ergebnisse der Detektionen aus Serum-cDNA der Kontrollgruppe	98

7.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: RNA-Expressionen der Mammakarzinom-Zelllinien	56
Tabelle 2: RNA-Expressionen in Mammakarzinom-Zelllinien bezogen auf GAPDH	57
Tabelle 3: Korrelationsanalyse der GAPDH-Kopienzahlen mit verschiedenen Parametern	61
Tabelle 4: Korrelationsanalyse der Ki-67-Kopienzahlen mit verschiedenen Parametern	62
Tabelle 5: Korrelationsanalyse der Rad51-RNA-Kopienzahl mit verschiedenen Parametern	64
Tabelle 6: Korrelationsanalyse der Hoj-1-Kopienzahl mit verschiedenen Parametern	65
Tabelle 7: Daten der Patientinnen M1-M20	99
Tabelle 8: Daten der Patientinnen M21 bis M37	100

8 Danksagungen

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Personen, durch die diese Arbeit überhaupt möglich wurde. Unter anderem gehören dazu...

Prof Dr. G. Sczakiel: für die Überlassung des Arbeitsplatzes und Materials, die vielen hilfreichen Diskussionen, die Bereitschaft sich trotz vollen Terminkalenders Zeit zu nehmen, für das Lesen des Skriptes sowie für die Fähigkeit, Wichtiges von Unwichtigem zu unterscheiden

Dr. Jens Warnecke: Für das interessante Thema, die überdurchschnittlich gute Betreuung, das Praktikum als Einstieg, die gründliche Einarbeitung, das Beibringen der Methoden, die vielen Diskussionen, das Ermutigen und das Korrekturlesen dieser Arbeit

Katrin Böttcher: für die vielen Anleitungen, die Teamfähigkeit und Hilfsbereitschaft, das Korrekturlesen und nicht zuletzt für die schöne gemeinsame Zeit im Labor

Meinen Blutspendern, die mir jederzeit bereitwillig ihren Arm entgegenstreckten: Katrin Böttcher, Dr. Marita Overhoff, Merle Hanke, Kirsten Frank, Sandra Laufer, Dr. Sandra Veldhoen, Dr. Dina Grohmann, Anna Lena Recke, Dr. Jens Warnecke, Miriam Mende Gabi Kreutzfeld und Dr. Rosel Kretschmer-Kazemi Far, die bei mir selber regelmäßig gekonnt Blut abgenommen haben

Martina Jahnke: für das zuverlässige Spülen, Pipettenspitzen stecken, Autoklavieren und die vielen anderen Arbeiten, die sie allen abnimmt

Gabi Kreutzfeld, ohne deren Überblick und Reserven vieles länger gedauert hätte

Herr Hein-Langendorf: für die vielen kleinen Hilfen beim Kampf mit defekten Geräten

Allen Mitarbeitern des Institutes für Molekulare Medizin: für Diskussionen, Hilfsbereitschaft, die tägliche Mittagsrunde und einfach die gute Atmosphäre, dank der ich immer gerne ins Institut gekommen bin

Dr. Kolberg und den Ärzten der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Lübeck: für das Rekrutieren der Mammakarzinompatientinnen und das Sammeln der Serumproben

Dr. Küster, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Lübeck: für das Zentrifugieren der Serumproben

Maren Drenckhan, Medizinische Klinik I: für die Überlassung der Fibroblasten-Primärzelllinie

Prof. Dr. Stürzbecher: für die prompte Überlassung der Rad51-Primersequenzen

Tine, Rüdiger und Lars für PC-Hilfen, Korrekturlesen, die bedingungslose Unterstützung und auch sonst alles andere