

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**QUALITÄTSKONTROLLE DER RNA-GEWINNUNG MIT
QUANTITATIVER REAL-TIME-PCR FÜR
VAKZINIERUNGSMETHODEN MITTELS DENDRITISCHER ZELLEN
BEI KOPF-HALS-TUMOREN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde
eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
STEPHAN PORSCH
aus Baden- Baden

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Sabine Adam, Institut für Immunologie,
Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. dent. Christof Dörfer, Klinik für
Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Universitätsklinikum
Schleswig- Holstein, Campus Kiel

Tag der
mündlichen 27.10.2011
Prüfung:

Zum Druck
genehmigt,
Kiel, den

gez. _____

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Kopf- Hals-Tumore.....	1
1.2.	Das Immunsystem.....	3
1.3.	Dendritische Zellen (dendritic cells, DC).....	4
1.4.	Neuer Therapieansatz bei der Tumorbehandlung: Vakzinierungs- strategien mittels dendritischer Zellen.....	5
1.5.	Problemstellung.....	7
1.6.	Arbeitshypothese und Zielsetzung.....	7
1.7.	Die Markergene.....	8
1.8.	Die quantitative Real-Time PCR.....	8
2.	Materialien und Methoden.....	11
2.1.	Materialien.....	11
2.1.1.	Geräte.....	11
2.1.2.	Reagenzien und Lösungen.....	11
2.2.	Gewebsentnahme.....	13
2.3.	RNA Homogenisierung.....	14
2.4.	RNA Isolierung.....	14
2.5.	Qualitätskontrolle der RNA Präparation.....	15
2.6.	Aliquotierung und Einfrieren.....	16
2.7.	Aufreinigung und Konzentrierung der RNA.....	16
2.8.	Etablierung/Validierung eines geeigneten Markergens mit herkömmlicher PCR.....	16
2.8.1.	Die verwendeten Markergene.....	16
2.8.2.	Reverse Transkription.....	17
2.8.3.	Herkömmliche PCR.....	17
2.8.4.	Gelelektrophorese.....	19
2.9.	Etablierung dreier Primerpaare für das Markergen.....	19
2.10.	Etablierung der qRT-PCR.....	20
2.10.1.	Die qRT-PCR.....	20
2.10.2.	Gelelektrophorese nach qRT-PCR.....	21
2.10.3.	Validierung mittels künstlicher Degradierung der RNA.....	21
2.10.4.	Validierung mittels RNA-Verdünnungsreihe.....	21
2.11.	Anhang zum Material und Methoden- Teil.....	22
3.	Ergebnisse.....	25
3.1.	Etablierung der Probenaufbereitung (RNA- Gewinnung aus Tumoren).....	25

3.2.	Etablierung/ Validierung des Markergens mittels herkömmlicher PCR an Tumoren.....	27
3.3.	Etablierung dreier Primerpaare für EpCAM mit herkömmlicher PCR.....	30
3.4.	Etablierung der qRT-PCR.....	33
3.4.1.	Die qRT-PCR mit den gefundenen Primerpaaren.....	33
3.4.2.	Validierung des Verfahrens mittels Degradierung der RNA.....	36
3.4.3.	Validierung des Verfahrens mittels RNA-Verdünnungsreihe.....	39
4.	Diskussion	40
4.1.	Diskussion der Materialien und Methoden.....	40
4.2.	Diskussion der Ergebnisse.....	43
4.3.	Schlussfolgerungen.....	44
5.	Zusammenfassung	45
6.	Anhang: Patientenfragebogen	47
7.	Literaturverzeichnis	49
8.	Danksagung	54
9.	Lebenslauf	55

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome, erworbenes Immundefektsyndrom
bp	Basenpaare
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsure
CP	Crossing point
DC	Dendritic cell(s), dendritische Zellen
ddH ₂ O	Double-distilled water, doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DÖSAK	Deutsch- Österreichisch- Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule, epitheliales Zelladhäsionsmolekül
GITC	Guanidinisothiocyanat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	MessengerRNA
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid, ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase Kettenreaktion
Surv	Survivin
Taq- Polymerase	Thermus aquaticus- Polymerase
TNM- Klassifikation	Tumor (-ausdehnung), Nodes (Lymphknotenbefall), Metastasen (-bildung)
tRNA	Transfer-RNA
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

UV-Licht

Ultraviolettes Licht

Abbildungsverzeichnis

[1] Entstehungsweise und Wirkort von dendritischen Zellen im Vergleich mit Makrophagen, Benninghoff, Drenckhahn: Anatomie. Urban und Fischer, 2008.....	5
[2] Impfstrategie mittels dendritischer Zellen, modifiziert nach einer Abbildung der Abteilung für Urologie der Universität von Innsbruck, Österreich.....	7
[3] Schema der quantitativen Real- Time- PCR, modifiziert nach der Abbildung „schematic PCR cycle with SYBR green dye“ auf einer französischen Wikimedia Commons Seite.....	9
[4] Fotographische Auswertung der Gelelektrophorese bei der Markergen-Suche mit Desmoglein 3.....	28
[5] Der Arbeitsbereich der Hyperladder I, www.bioline.com	28
[6] Fotographische Auswertung der Gelelektrophorese mit spezifischen Primern für Aktin und EpCAM.....	29
[7] Fotographische Auswertung der Gelelektrophorese mit spezifischen Primern für Survivin.....	29
[8] Positionen der getesteten Primersequenzen auf dem EpCAM Gen, www.ncbi.nlm.nih.gov	31
[9] Früher Versuch der Primeretablierung für EpCAM.....	31
[10] Arbeitsbereich der Hyperladder V, www.bioline.com	31
[11] PCR mit Haut- RNA und veränderten Einstellungen.....	32
[12] Letztes Gel zur Primeretablierung mit herkömmlicher PCR.....	33
[13] Etablierung der qRT-PCR.....	34
[14] Schmelzkurvenanalyse.....	35
[15] Validierung mittels Degradierung der RNA.....	36
[16] Diagramm der CP's für Degradierungsversuch mit Speichel	37
[17] Diagramm der CP's für Degradierungsversuch mit RNase.....	38
[18] Diagramm der CP's für Verdünnungsreihe.....	39

1. Einleitung

1.1. Kopf- Hals Tumore

Kopf- Hals Tumore sind auch heute noch ernst zu nehmende Tumorerkrankungen. Ihre Häufigkeit ist zunehmend (Reichart et al. 2003). Unter dem Begriff wird eine Vielzahl verschiedener Tumore in diesem Bereich zusammengefasst. Sie machen ca. 5% aller Tumorerkrankungen aus (Morgenroth et al. 1996) und sind durch eine Prädilektion von 2:1 für das männliche Geschlecht gekennzeichnet. Nach Untersuchungen der DÖSAK (Deutsch- Österreichisch- Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich) ist ein Altersgipfel zwischen dem fünften und sechsten Lebensjahrzehnt festzustellen, der sich im Vergleich zu früheren Untersuchungen vorverlagert hat (Mohr 1997). Die Inzidenz in Deutschland beträgt ca. 7:100.000. Über 90% der Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithel-Karzinome (Reichart et al. 2003, Ganly et al. 2000). Die am häufigsten vorkommenden Tumore im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich sind die Lippen-, Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome (Morgenroth et al. 1996). Die Stadieneinteilung und Klassifikation erfolgt nach der Systematik des TNM-Systems der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) (Howaldt et al. 1999). Als Risikofaktoren, besonders für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen, sind Alkohol- und Nikotinabusus zu nennen (Onoda et al. 2001, Griz et al. 1991). Aber auch andere Ursachen spielen eine Rolle. Es ist zum Beispiel heute die Rede von der sogenannten „Multi-step-carcinogenesis“ (Barret 1993), die besagt, dass die Karzinogenese der Mundschleimhaut ein schrittweiser Prozeß ist, der von genetischen Veränderungen (z.B. Mutationen von Tumorsuppressorgenen und deren Funktionsverlust) angetrieben wird und dessen Stadien histologisch und klinisch eindeutig identifizierbar sind. Es gibt drei Grundprinzipien für die Therapie dieser Tumorerkrankungen. Dazu gehören die Operation, zu der oft auch die Entfernung der Halslymphknoten der betroffenen Seite (neck dissection) gehört, die Strahlentherapie und die Chemotherapie. Welche Therapieformen wann angewendet werden, beziehungsweise wie sie kombiniert werden, hängt von der Tumorart (Typing), von dem Malignitätsgrad (Grading) und der Ausbreitung (Staging) ab. Die chirurgische Intervention ist entweder kurativ oder palliativ intendiert. Eine dauerhafte Heilung ist nur durch eine vollständige Entfernung des Tumorgewebes möglich. Die Entscheidung über die Resektabilität wird aufgrund der Größe des Primärtumors und des vorliegenden Lymphknotenbefalls getroffen (Reichart et al. 2003).

Die Strahlentherapie wird zur Zerstörung der Tumorzellen eingesetzt. Ein Nachteil hierbei ist, dass auch gesundes Gewebe, welches sich im Strahlengang befindet, zum Teil erheblich geschädigt werden kann. In frühen Tumorstadien wird diese Therapieform auch als alleinige Therapie eingesetzt (definitive Strahlentherapie). Häufiger wird sie jedoch im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes als prä- oder postoperative Maßnahme durchgeführt (Reichart et al. 2003). Die Chemotherapie wird heute ebenfalls stets in das multimodale Therapiekonzept eingefügt. Dabei werden folgende Strategien verfolgt: palliative Chemotherapie (zur Linderung rezidivbedingter Symptome), adjuvante Chemotherapie (nach Abschluß der definitiven Behandlung zur Bekämpfung von Mikrometastasen und mikroskopischen Tumorresten), Induktionschemotherapie (vor Beginn der definitiven Behandlung, zu diesem Zeitpunkt ist die Durchblutung des Tumors durch andere Maßnahmen noch nicht gestört, das Zytostatikum kann gut wirken) und kombinierte Radio-Chemotherapie (erhöhte biologische Wirksamkeit). Dabei ist entscheidend, zu welchem Zeitpunkt mit der Chemotherapie begonnen wird (Pignon et al. 2000).

Tumorbehandlungen im Kopf-Hals-Bereich sind häufig schwierige und schwerwiegende Eingriffe, die durch entstellende Operationen die Betroffenen stark belasten und zu weitreichenden Funktionseinbußen der Sinnesorgane führen können. Vielen Patienten ist eine normale Nahrungsaufnahme nicht mehr möglich und sie verlieren eventuell ihre Stimme nach Entfernung des Kehlkopfes. Dazu kommt, dass häufig Rezidive auftreten, durch nicht erkannte oder erkennbare Mikrometastasen in Lymphknoten oder durch die Tatsache, dass die Primärtumore eine so große Ausdehnung aufweisen, dass nur eingeschränkt radikalchirurgisch therapiert werden kann. Auch Zweitkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes, unter anderem in Folge der weiter einwirkenden Noxen (Tabak, Alkohol), treten in 4% bis 30% der Fälle auf (Eckardt 1993). Das Plattenepithelkarzinom hat eine fünf- Jahres-Überlebensrate von ca. 40% (Platz et al. 1988).

All diese Umstände zeigen die Schwierigkeiten bei der Behandlung dieser Tumorerkrankungen auf und lassen das Bedürfnis nach neuen Therapieansätzen entstehen.

1.2. Das Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bekämpft eindringende Pathogene schnell und unspezifisch. Es ist daher dem erworbenen Immunsystem überlegen, wenn ein Pathogen mit einer hohen Reproduktionsrate in den Körper eindringt und sich in diesem schnell vermehrt. Das erworbene Immunsystem dagegen ist zwar in der Reaktionszeit viel langsamer, dafür aber spezifischer. Dringt jetzt ein Pathogen ein, wird es erst von dem angeborenen Immunsystem bekämpft, indem die unspezifische humorale Abwehr, bestehend unter anderem aus den Proteinen des Komplementsystems, dem Lysozym, den Defensinen, den Interferonen und dem Akute-Phase-Protein, aktiviert wird. Das führt zur Anlockung (Chemotaxis) von Phagozyten. Der Endothelzellverband wird aufgelockert und die Phagozyten können in das Gewebe übertreten. Von der unspezifischen zellulären Abwehr kann jetzt das Pathogen phagozytiert werden. Es ist durch Oponine (einige Komplementkomponenten, das C reaktive Protein und an Zellen gebundenes ImmunglobulinG) zusätzlich markiert (Thews und Vaupel 2001). Die unspezifische zelluläre Abwehr besteht aus den natürlichen Killerzellen, den Mastzellen und den Phagozyten. Die Phagozyten unterteilen sich in die neutrophilen Granulozyten, die Monozyten, die Makrophagen sowie die dendritischen Zellen. Makrophagen und dendritische Zellen halten sich im Gewebe auf und phagozytieren Pathogene. Nach erfolgter Phagozytose werden Antigene prozessiert und den Zellen des erworbenen Immunsystems präsentiert. Zu den Zellen des erworbenen Immunsystems gehören die T-Lymphozyten und die B-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten unterteilen sich in mehrere Subtypen. Die wichtigsten sind die T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen (=T-Killerzellen) sowie die T-Regulatorzellen. Neben den Zellen des erworbenen Immunsystems gibt es auch noch das humorale erworbene Immunsystem (=Antikörper). Dieser Teil des Immunsystems arbeitet eng mit dem erworbenen zellulären Immunsystem (den B-Lymphozyten) zusammen. Es wird durch einen Antigen-Antikörper-Kontakt ausgelöst. Die immunologisch kompetenten (mit spezifischen Oberflächenmolekülen ausgestatteten) B-Lymphozyten proliferieren und entwickeln sich zu Plasmazellen, die dann identische Antikörper sezernieren. Die Antikörperbildung beginnt etwa 5-7 Tage nach dem Kontakt eines Antigens mit einem B-Lymphozyten. Davor werden die Antigene mittels des unspezifischen Immunsystems bekämpft. Die wichtigste Wirkung der Antikörper ist die Neutralisation von Antigenen durch eine Bindung untereinander, was eine Blockade der toxischen

Wirkung bedeutet. Neben diesen aktiven immunologischen Abwehrreaktionen werden noch B- und T- Gedächtniszellen ausgebildet, die bei einem erneuten Angriff der für sie passenden Pathogene in Aktion treten.

1.3. Dendritische Zellen (dendritic cells, DC)

Entdeckt wurden die dendritischen Zellen (im Folgenden auch „DC“ genannt) im Jahr 1973 von Steinman und Cohn an der Rockefeller University in New York in der Milz von Mäusen (Steinman et al. 1975, 1978). Doch bereits 100 Jahre früher entdeckte der deutsche Medizinstudent Paul Langerhans dendritische Zellen in der Haut, die daraufhin Langerhanszellen genannt wurden. Steinmans Arbeitsgruppe und die Gruppe um Schuler und Romani fanden heraus, dass es sich hierbei um die gleiche Zellgruppe handelt (Steinman et al. 1975, 1978, Schuler et al. 1983). Dendritische Zellen stammen, wie alle Leukozyten, von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab. Von dort wandern sie als immature Zellen in viele Gewebe und Organe. Die sehr potenten Antigen präsentierenden Zellen induzieren unter anderem eine zytotoxische T-Zellantwort. Dabei sind die DC wenigstens 100 Mal effektiver als andere Zell-Unterklassen wie B- und T- Lymphozyten und Makrophagen (Steinman et al. 1978). Zudem sind diese Zellen auch in der Lage, Autoimmunreaktionen zu minimieren, da sie körpereigene Antigene tolerieren (Banchereau und Steinman 1998, Cools et al. 2007). Die dendritischen Zellen befinden sich im nicht lymphoiden Gewebe in einem immaturren Zustand. Sie sind in der Lage unterschiedliche Antigene (Mikroorganismen, Antigen-Antikörperkomplexe, apoptotische und nekrotische Zellen) aufzunehmen. Nach der Antigenbeladung wandern die DC in die lymphoiden Gewebe und reifen durch zellbiologische Veränderungen. Dort präsentieren sie nach der Prozessierung mit Hilfe der MHC Moleküle Klasse I und II die Antigene den T-Zellen und aktivieren dadurch nur solche, die spezifisch das mitgebrachte Antigen erkennen. Dann folgt eine klonale Expansion und Differenzierung der so aktivierten T-Zellen, die dann in das erkrankte Gewebe wandern. Im Gegensatz zu Makrophagen verlieren DC die einmal gebildeten immunogenen Moleküle auf der Zelloberfläche nicht mehr. Zusätzlich exprimieren DC kostimulatorische Moleküle und potente Zytokine. Nach erfolgter Funktion sterben die Zellen ab. Die Abbildung 1 stellt die Entstehung und die Wirkorte von dendritischen Zellen denen von Makrophagen gegenüber.

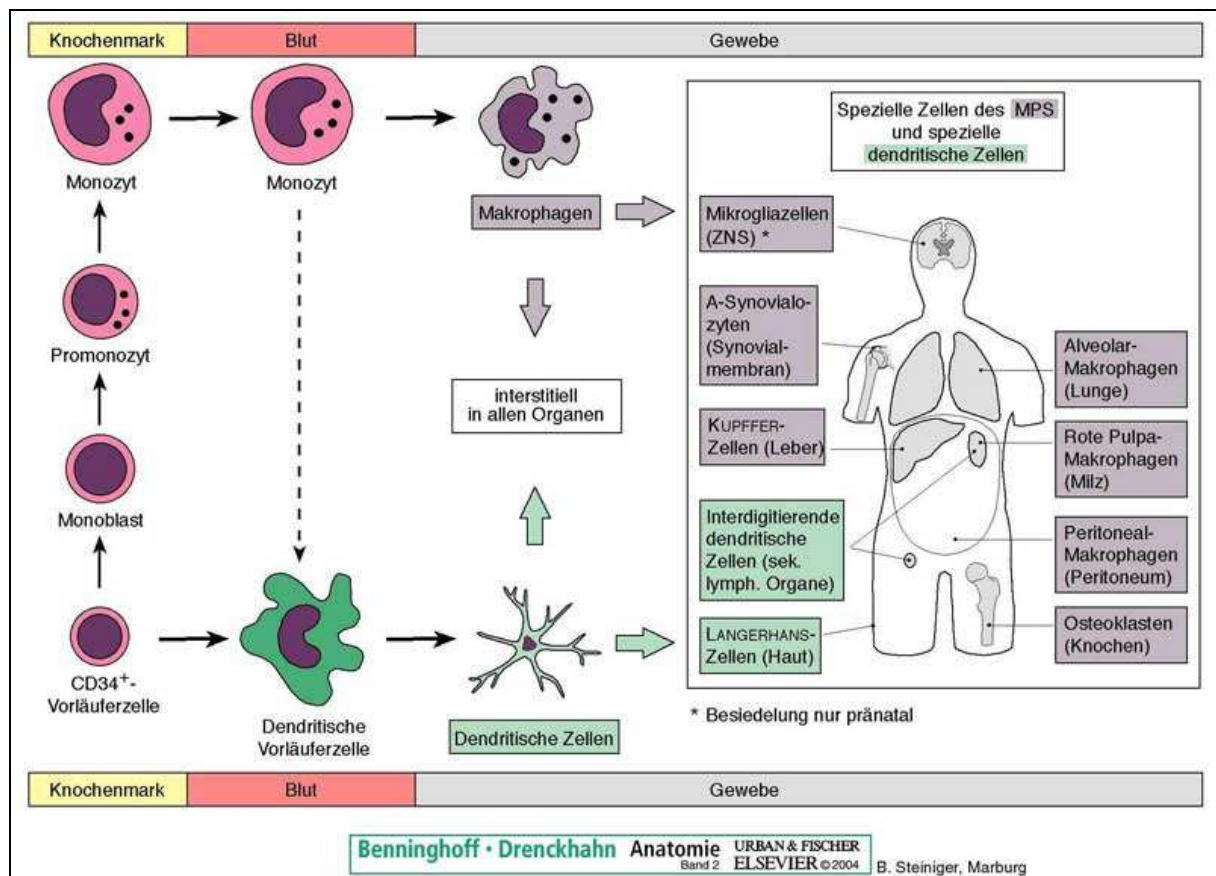


Abbildung 1: Entstehungsweise und Wirkort von dendritischen Zellen im Vergleich mit Makrophagen, Benninghoff, Drenckhahn: Anatomie. Urban und Fischer, 2008

1.4. Neuer Therapieansatz bei der Tumorbehandlung:

Vakzinierungsstrategien mittels dendritischer Zellen

Die in Kapitel 1.3. geschilderten Eigenschaften der DC versucht man sich bei vielen Behandlungsstrategien von Tumorerkrankungen, aber auch bei AIDS zu Nutze zu machen (Jarnjak-Jankovic et al. 2007).

Die Immuntherapie auf mit DC basierten Tumorstoffen hat sich zu einem alternativen Behandlungsansatz mit zytotoxischer T-Lymphozyten-Antwort mit therapeutischer Effektivität entwickelt (Nelson et al. 1996). So gibt es Ansätze der Behandlung von Nierentumoren, Prostatakarzinomen und malignen Melanomen mit DC (Nestle et al. 1998, Kyte et al. 2006). In einer klinischen Studie der Phase I konnte gezeigt werden, dass RNA-transfizierte DC in Patienten mit metastasierenden Prostata Karzinomen eine Induzierung von Prostata spezifischen T-Lymphozyten bewirken (Heiser et al. 2002). Eine weitere in vitro-Studie belegt die Effizienz der T-Zell Antwort auf - mit autologer RNA aus Nierenkarzinomen transfizierte - DC. Diese Effizienz resultierte aus einer T-Zell Antwort auf ein breites Repertoire bisher unidentifizierter Antigene. Dabei wurde klar, dass nicht nur Metastasen bekämpft

werden können, sondern auch der Primärtumor. Außerdem kam es zu keiner Kreuzreaktion mit Antigenen von normalem Gewebe (Heiser et al. 2001).

Eine weitere Untersuchung belegte, dass RNA transfizierte DC eine gute Strategie für die Entwicklung von Anti-Tumor-Vakzinen darstellt (Ponsaerts et al. 2003).

Auch bei der Bekämpfung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Hals Bereich kann mit einer Induzierung einer T-Zell Antwort gerechnet werden (Xu et al. 2006, Dunn et al. 2005). Bei diesen Tumor- Patienten könnte die Antitumor- Impfung eine wirksame Sensitivierung des Immunsystems bewirken, da Tumorzellen sich ja sonst einer Erkennung durch das Immunsystem entziehen. Sinnvoll wäre es, diese Therapie in einer Kombination mit konventionellen Therapieverfahren einzusetzen (Whiteside 2007). In einer Pilot- Studie dieser Arbeitsgruppe wurden 20 Patienten mit plattenepithelialen Kopf- und Halskarzinomen mit postoperativen Antitumor- Impfungen mit autologen Virus-modifizierten Tumor-Vakzinen behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Anhebung der 5-Jahres Überlebensrate erwirkt werden konnte (Karcher et al. 2004). Hier wurde zwar nicht mit DC vakziniert, aber so wurde doch die enorme Potenz der T-Zellen deutlich, da auch nach 5- 7 Jahren nach der letzten Impfung noch Tumor- reaktive T-Zellen im peripheren Blut zu finden waren. Dies veranschaulicht den guten Langzeiteffekt der Impfungen, die T- Zellantworten einleiten sollen. Wenn es um die Beladung der dendritischen Zellen geht, scheint die Methode der Wahl die Elektroporation von RNA zu sein, in Bezug auf die Effektivität und die anschließende Aktivierung einer T-Zell Antwort (Ueno et al. 2004, Van Tendeloo et al. 2001, Ponsaerts et al. 2003). Das Verfahren beruht auf der Tatsache, dass durch das Anlegen einer kurzen, starken elektrischen Spannung für den Moment der Spannungswirkung kleine Poren in der Zellmembran entstehen und die Semipermeabilität der Zellmembran aufgehoben wird. So können Makromoleküle, wie hier die RNA, in die Zelle transfiziert werden. Die Poren entstehen, weil Ionen im Transfektionsmedium durch das Anlegen der Spannung wandern und sich an die für sie (noch) undurchlässige Zellmembran der Zellen, anlagern. Im Zytoplasma wird durch das Wandern der gleichpoligen Ionen zur gegenüberliegenden Membran ein Transmembranpotenzial aufgebaut, das, wenn es einen kritischen Wert übersteigt, zum Aufreißen der Membran führt.

Die Methodik der Elektroporation von dendritischen Zellen ist seit einiger Zeit ein standardisiertes Verfahren auf dem Gebiet der Herstellung von Antitumor-Vakzinen, aber auch bei der Bekämpfung von vielen anderen Krankheiten (Nestle et al. 1998,

Heiser et al. 2001, Mangeot et al. 2002, Nair et al. 2002, Shibagaki und Udey 2002, Scott-Taylor et al. 2000). Dies wird auch durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Van Driessche untermauert, die besagen, dass die mRNA Elektroporation ein starkes und vielseitig einsetzbares Werkzeug ist. (Van Driessche et al. 2005) Allerdings wurden in dieser Arbeit nur kurze Genabschnitte untersucht.

Die DC können aus peripheren Blut- Monozyten kultiviert werden.

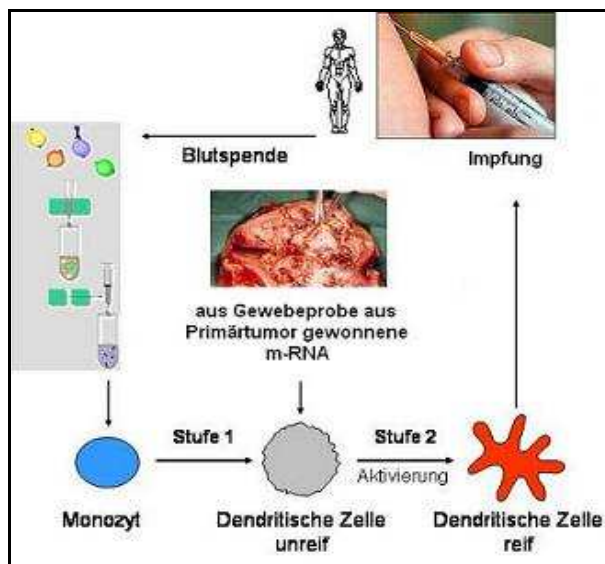


Abbildung 2: Impfstrategie mittels dendritischer Zellen, modifiziert nach einer Abbildung der Abteilung für Urologie der Universität von Innsbruck, Österreich

1.5. Problemstellung

Die zelluläre Immuntherapie mit DC, die mit Tumor RNA transfiziert wurden, bringt das Problem mit sich, dass eine Qualitätskontrolle der Tumor RNA bisher nur bedingt möglich war.

Lösungsansätze dieses Problems beschränken sich auf qualitative oder bestenfalls semiquantitative Verfahren (Spektroskopie, Gele, PCR von kurzen Fragmenten).

1.6. Arbeitshypothese und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, ein Messverfahren zu entwickeln, welches eine quantitative Aussage zum Zustand der RNA ermöglicht. Die Arbeitshypothese ist, dass dies mittels quantitativer PCR dreier Abschnitte eines geeigneten Markergens möglich ist.

Es ergeben sich daraus folgende Einzelziele:

1. Etablierung der Probenaufbereitung (Gewinnung von RNA aus Tumoren)
2. Suche nach einem geeigneten Markergen mit herkömmlicher PCR
3. Etablierung der quantitativen Real-Time PCR
4. Validierung des Verfahrens mittels RNA-Verdünnungsreihe und „künstlicher“

Degradierung der RNA.

1.7. Die Markergene

Für die spätere Transfektion der dendritischen Zellen war es erforderlich, ein geeignetes Markergen zu finden, welches die dendritischen Zellen nicht selber exprimieren, wohl aber von Kopf-Hals-Tumorzellen exprimiert wird. Außerdem sollte es eine repräsentative Länge aufweisen, sowie eine Entwicklung brauchbarer Primerpaare möglich sein. Es wurden mehrere Markergene auf ihre Eignung untersucht:

1. das 30-35 kb lange pemphigus vulgaris Antigen Desmoglein 3
2. den Apoptose-Hemmer Survivin
3. das Tumor-assoziierte epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM

Es wurden drei Abschnitte des Markergens durch PCR amplifiziert, damit untersucht werden konnte, ob das Gen in seiner vollen Länge intakt war. Dazu wurden drei Primerpaare eingesetzt, die PCR-Produkte ergaben, die jeweils das Startcodon (5'-Produkt), das Stopcodon (3'-Produkt) und eine Sequenz in der Mitte (Mid-Produkt) der RNA einschließen. Wenn also die Tumorproben dieses Gen exprimieren und es nicht in DC vorkommt, war es brauchbar als Markergen.

1.8. Die quantitative Real-Time PCR

Die Methode der quantitativen Real-Time Reverse Transkriptase-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (nach erfolgter Reverse Transkriptase-Reaktion) und weist zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung während eines PCR-Zyklus in Echtzeit auf. Diese qRT-PCR ist nicht zu verwechseln mit der „einfachen“ Reverse Transkriptase-PCR, die in der Literatur mit RT-PCR abgekürzt wird.

Die Quantifizierung geschieht auf dem Wege der Messung der Fluoreszenz. Diese nimmt proportional mit der Masse der PCR-Produkte zu. Als interkalierender Fluoreszenz-Farbstoff wird SYBR Green I (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Der Farbstoff bindet an die doppelsträngige DNA.

Daraus resultiert ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, der blaues Licht bei einer Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494\text{nm}$ absorbiert und grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 521\text{nm}$ emittiert.

Durch eine nach Ablauf der PCR durchgeführte Schmelzkurvenanalyse wird die Fragmentlänge und so die Spezifität der Produkte bestimmt. Dabei wird die DNA

aufgeschmolzen und dann die Temperatur langsam erniedrigt, so dass sich bei einer für jede Sequenz spezifischen Temperatur aus den Einzelsträngen wieder Doppelstränge bilden und die Fluoreszenz ansteigt. Zusätzlich lässt sich so feststellen, ob sich Primer-Dimere gebildet haben. Primer-Dimere sind Primer, die aufgrund von komplementären Basen innerhalb ihrer Stränge aneinanderheften. Dadurch werden diese Primer unbrauchbar. Diese Methode ist eine sehr sensitive Messung, die genaue Aussagen über die Qualität der eingesetzten Markergene erlaubt.

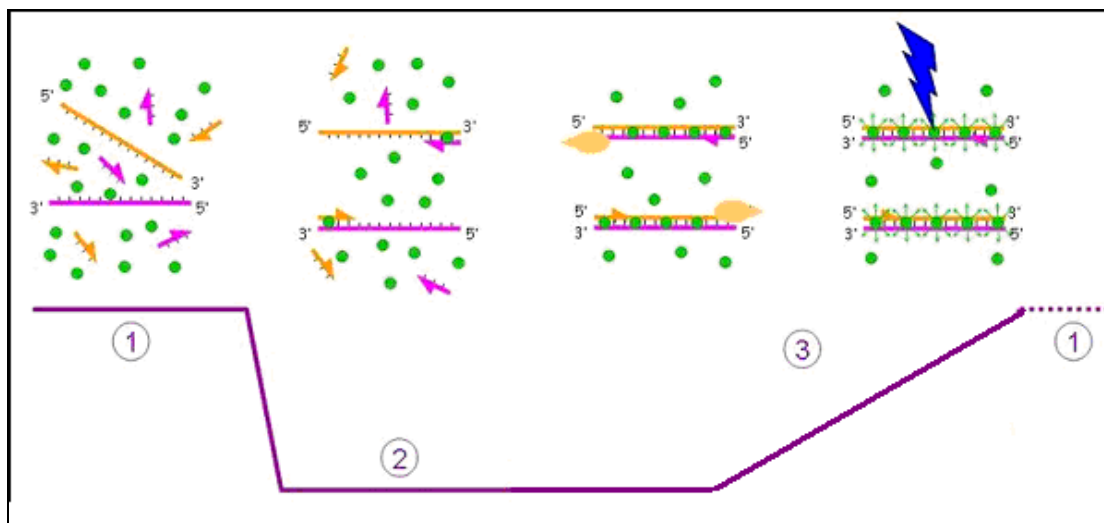


Abbildung 3: Schema der quantitativen Real-Time-PCR, modifiziert nach der Abbildung „schematic PCR cycle with SYBR green dye“ auf einer französischen Wikimedia Commons Seite

Dieses Schema beschreibt nicht den Ablauf der herkömmlichen PCR, dort sind andere (Temperatur- und Zeit-) Bedingungen gefordert!

Lila Linie: Temperatur-Verlauf

1: Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wird auf 95°C für 30s erhitzt. Das führt zur Trennung der komplementären Stränge. Bei dem ersten Zyklus wird diese Temperatur länger gehalten (5min), da eine so genannte hot start- Taq-Polymerase verwendet wird, die durch diese anfängliche längere Hitzeeinwirkung erst aktiviert werden muss und die PCR so „automatisch“ startet.

2: Primer annealing: Die Primerpaare (Pfeil-Symbole) lagern sich bei einer Temperatur von 55°C für 45s an die Einzelstränge an. Die Wahl dieser Temperatur hängt von der Länge und der Sequenz der Primer ab. Bei zu niedriger oder zu hoher Temperatur kommt es zur fehlerhaften oder gar keiner Anlagerung. Aus diesem Grund wird eine Temperatur 2-3°C unter dem Schmelzpunkt der Primersequenzen gewählt.

3: Elongation (Polymerisation, Extension): Die DNA- Polymerase (Tropfen-Symbol) leistet die Synthese des komplementären Stranges. Dabei wird der Farbstoff eingebaut. Die DNA- Polymerase hat ein spezielles Temperatur-Optimum. Die hier verwendete DNA- Polymerase ist, wie beschrieben, eine Taq- Polymerase, die bei Temperaturen von 75-80°C ihr Optimum hat. Sie hat zudem eine Halbwertszeit von 9min bei 97,5°C und kann einen 1000 Basenpaare langen Strang in weniger als 10s synthetisieren. Der Farbstoff emittiert dann grünes Licht, nachdem er mit blauem bestrahlt wurde (blaues Blitz-Symbol). Dieses Licht wird mithilfe einer Kamera

detektiert.

In dieser Abbildung wurde der erste Aufheiz-Schritt für 30min bei 50°C nicht erwähnt. Er befindet sich vor Punkt 1 und dient dazu, gute Synthese-Bedingungen für den Ablauf der reverse Transkriptase- Reaktion, die ja vor der eigentlichen PCR erfolgen muss, zu schaffen. Dazu wird die SuperScript III Reverse Transkriptase verwendet.

Dadurch, dass alle Reaktionen in einem Gerät, dem iCycler (Bio Rad Laboratories GmbH, München), ablaufen, ist die Gefahr der Kontamination verringert. Zudem befinden sich in den zugeführten Reaktionslösungen Komponenten, die für einen reibungslosen Ablauf sorgen. So besitzt die Platinum Taq Polymerase, die für das Kettenwachstum zuständig ist, einen speziellen Antikörper, der die Polymerase-Aktivität bei bestimmten Temperaturen verhindert (zum Beispiel beim Annealing). Das erlaubt eine genaue Steuerung während der PCR-Zyklen. Die Taq Polymerase hat die Eigenschaft, dass sie hohe Temperaturen verträgt. Daher denaturiert sie bei Erhitzung während der Polymerase-Kettenreaktion nicht. Sie muß nicht nach jedem Zyklus neu hinzugegeben werden. Außerdem ist ein RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor für die Vermeidung einer RNase Kontamination beigefügt.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

- sterile 250-ml Polypropylen Container (Falcon 4015, Becton Dickinson, Heidelberg, D)
- Rotor-Stator-Homogenisierer (Omni International Inc., Süd-Laborbedarf, Gauting, D)
- Lambda 2 UV/VIS Photometer (Perkin-Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA)
- iCycler (Bio Rad Laboratories GmbH, München, D)
- ReadyAgarose Precast Gel System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D)
- Thermocycler (Biometra, Göttingen, D)
- Mikrotiterplatten (Nuc, Wiesbaden, D)
- 1,2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf-Cups; Sarstedt, Nümbrecht, D)

2.1.2. Reagenzien und Lösungen

- RNAlater Transferlösung (Ambion Inc., Austin, USA)
- Molecular grade Ethanol
- RNase-freies, steriles Wasser
- Reagenzien und Lösungen der Firma Quiagen GmbH, Hilden, D:
 - RNeasy Maxi Kit, bestehend aus:
 - RLT Lysepuffer (10 µl β- Mercaptoethanol auf 1ml Lysepuffer)
 - RW1 Waschpuffer
 - RPE Waschpuffer
 - RNeasy Säulen 50
 - 50 ml Sammelröhrchen
 - Omniskript Reverse Transkription Kit (50), bestehend aus:
 - Omniskript Reverse Transkriptase
 - 10x Puffer RT
 - dNTP Mix
 - HotStarTaq Master Mix, bestehend aus:
 - 2,5 U HotStarTaq DNA Polymerase in 1xPCR Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ und 200µM je dNTP
- RNA aus menschlicher Haut mit 1,85 µg/µl RNA (BioChain, Hayward, USA)

- DEPC behandeltes destilliertes Wasser (ddH₂O)
- Reagenzien und Lösungen der Firma Invitrogen, Karlsruhe, D:
 - Super Script III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit bestehend aus:
 - SYBR Green One-Step Enzyme Mix bzw. Taq Polymerase
 - SYBR Green Reaction Mix
 - Bovine Serum Albumin
- Reagenzien und Lösungen der Firma Bioline GmbH, Luckenwalde, D:
 - 5x Ladepuffer HLB-101
 - Hyperladder I
 - Hyperladder V
 - Tri-Colour DNA Ladepuffer
- Reagenzien und Lösungen der Firma TiBMolBiol, Berlin, D:
speziell entwickelte Primer für folgende Gene:
 - pemphigus vulgaris Antigen Desmoglein 3
 - Apoptose- Hemmer Survivin
 - Strukturprotein Aktin
 - Tumor-assoziiertes epitheliales Zelladhäsionsmolekül EpCAM
- Reagenzien und Lösungen der Firma Promega GmbH, Mannheim, D:
 - Oligo(dt)₁₅ Primer
 - Random (Hexamer) Primer
- TAE(1x) Puffer (Tris-Acetat-EDTA – Puffer) aus einer 50x TAE Stocklösung:
 - 242 g Tris (base), 57,1 ml Essigsäure (konz.) und 100ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
gelöst in 1 l Wasser
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, München, D)
- Agarose (Sigma-Aldrich, München, D)
- RNase A aus dem NucleoBond Xtra Maxi Plus Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D)

2.2. Gewebsentnahme

Im Rahmen von therapeutisch intendierten Eingriffen bei Tumorpatienten wurden Gewebeproben entnommen. Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die Studie genehmigt (AZ D 309/01). Das Verfahren beruht auf einem Vorgang der Biopsie aus einem Tumor, ohne nur für diesen Zweck zu radikalchirurgisch vorzugehen. Die Patienten gaben dafür eine schriftliche Einverständniserklärung ab (siehe dazu auch „Einwilligung“ und „Gewebspenderinformation“ im Anhang). Die Patientendaten wurden verschlüsselt, und eine namentliche Nennung erfolgte zu keinem Zeitpunkt.

Bei der Gewebsentnahme wurde versucht, eine Probe ohne viel Bindegewebe zu entnehmen, da dies bei der späteren Homogenisierung dazu hätte führen können, dass das Gewebe nicht ausreichend zerkleinert worden wäre. Unter anderem war es hier von Vorteil, eine Gewebeprobe zentral aus dem Tumorgewebe zu entnehmen, da davon ausgegangen werden konnte, dass die Konzentration an Tumorzellen dort relativ hoch war. Die Tumorgewebe-Konzentration wurde aus einer direkt an die Gewebeprobe angrenzenden Probe histopathologisch bestimmt.

Die Tumore waren im Kopf und Halsbereich lokalisiert. Es handelte sich um epitheliale Primärtumore unterschiedlicher Ausdehnung mit unterschiedlichem Grading und Staging. Es wurde keine Abgrenzung des Patientenkollektives hinsichtlich Alter, Geschlecht oder histologisch bestimmte Tumorart unternommen.

Da RNA leicht zerfällt, wurde das entnommene Gewebe gleich nach der Exzision in ein Transfergefäß (50 ml Sammelröhrchen) überführt, welches mit einer Transferlösung gefüllt worden war. Dies geschah, um das Untersuchungsmaterial haltbar zu machen, beziehungsweise einer Degradierung der sensiblen RNA vorzubeugen.

Diese Transferlösung bestand aus dem RNAlater (Ambion, Hamburg, D). Sie bietet eine unkomplizierte Möglichkeit der Haltbarmachung für einen Tag bei 37°C, sieben Tage bei 18-25°C, vier Wochen bei 2-8°C oder zum Archivieren bei -20°C oder -80°C. Somit umging man andere Methoden wie Schockgefrieren in Flüssigstickstoff. Die Größe des Gewebes betrug maximal 5 mm Kantenlänge, um eine ausreichende Diffusion der Transferflüssigkeit zu gewährleisten. Um später Aussagen zur RNA-Ausbeute machen zu können, wurde die Gewebeprobe gewogen. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei 20°C, wenn die Probe am nächsten Tag aufbereitet wurde und vorsichtshalber bei 4°C, wenn die

Probe nach maximal 7 Tagen aufbereitet wurde.

2.3. RNA Homogenisierung

Es erforderte eine Homogenisierung des Ausgangsmaterials, um die RNA aus der Zelle zu lösen. Zu diesem Zweck wurde ein Rotor-Stator-Homogenisierer (Omni International Inc., Sud-Laborbedarf, Gauting, D) unter Verwendung eines RNase-freien Omni Tip Adapters verwendet. Durch die hochtourige Drehzahl des Gerätes werden die Zellwände aufgebrochen. Durch die Turbulenzen und auftretenden Scherkräfte wurde die Probe homogenisiert. Es kam dabei nicht immer zu einem kompletten Aufschluss. Meistens verblieb ein kleiner Geweberest, der verworfen werden mußte. Die Homogenisierung erfolgte im RLT Lysepuffer aus dem RNeasy Kit, einem stark denaturierenden, Guanidiniisothiocyanat (GITC) enthaltenden Puffer, durch den RNasen sofort effizient inaktiviert werden, sodass die Isolierung einer intakten RNA gewährleistet wird. Dem Lysepuffer wurde zuvor β -Mercaptoethanol in der vom Hersteller vorgeschriebenen Konzentration hinzugefügt. Es wurden 10ml RLT Puffer pro 1g Gewebe verwendet. Um die auftretende Reibungswärme abzuführen, wurde auf Eis homogenisiert. Damit sich die nicht homogenisierbaren Bestandteile der Probe von den homogenisierten trennten, wurde für 5 min bei 5000xg (entspricht 5.500 rpm) und 20°C in einer Megafuge 1.0 (Heraeus Instruments, Hanau, D) zentrifugiert.

2.4. RNA Isolierung

Die RNA Isolierung wurde mit dem RNeasy Kit (Quiagen, Hilden, D) vorgenommen. Die Vorgehensweise folgte dem Protokoll des Herstellers (RNeasy Maxi Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues, June 2006). Für das Maxi Kit wird laut Hersteller idealerweise eine Gewebemenge von 150 bis 250 mg benötigt, um eine hohe Ausbeute an reiner RNA zu erhalten. Die maximale Gewebemenge ist limitiert durch das Volumen, welches 6 mg RNA trägt, sowie durch das Volumen des Lysepuffers RLT und die RNA Bindungskapazität der RNeasy Säule. Mit der RNeasy Methode wurden RNA-Moleküle mit einer Länge von über 200 Nukleotiden isoliert. Die meisten RNA-Spezies mit weniger als 200 Nukleotiden Länge werden durch das Verfahren abgetrennt. Darunter fallen zum Beispiel 5,8S-rRNA, 5S-rRNA und tRNAs, die zusammen 15–20% der Gesamt-RNA ausmachen. Diese Separierung wird durch die selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran mit einer

Zentrifugationstechnik bewirkt. Es kommt so zu einer Anreicherung der mRNA. Der Überstand, der nach dem Homogenisieren und Zentrifugieren aus Kapitel 2.3. verblieb, wurde in ein neues Sammelröhrchen überführt und das gleiche Volumen an 70%igem Ethanol hinzugegeben. Das war nötig, um optimale Bindungsbedingungen an der Silica-Membran bei der nun folgenden Beladung der RNeasy Maxi Column herzustellen. Danach wurde unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben zentrifugiert und somit lief die Probe/Ethanol-Mischung durch die Membran. Der Durchlauf wurde verworfen. Dabei band die Gesamt-RNA an die Membran. Die übrigen Bestandteile wurden mit Hilfe von Puffern herausgewaschen. Als Waschpuffer wurde zunächst 15ml des Puffers RW1 aus dem RNeasy Maxi Kit verwendet. Nach dem Auftragen dieses Puffers wurde wie gewohnt zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Säule wurde dann auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt, um auch kleinste Verschleppungen des Puffers auszuschließen und mit 10ml des zweiten Waschpuffers, dem Puffer RPE aus dem Kit, beladen. Dieser Puffer wurde als Konzentrat vom Hersteller geliefert und nach Anleitung mit Ethanol verdünnt. Im Anschluß wurde wieder zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Abermals wurden nun 10ml Puffer RPE aufgetragen, zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Zum Trocknen der Membran wurde anschließend nochmals zentrifugiert. Dies war wichtig, da Ethanol-Reste nachfolgende Reaktionen beeinflusst hätten. Für die Elution wurde die Säule auf ein neues Sammelröhrchen überführt. Es wurden 800µl RNase freies Wasser auf die Mitte der Membran aufgetragen. Das Röhrchen wurde eine Minute stehen gelassen, dann erfolgte eine Zentrifugation. Um eine höhere Endkonzentration zu erhalten, wurde der Durchlauf (also das Eluat) erneut aufgetragen und zentrifugiert. Hierbei war dann aber die Ausbeute um 15% bis 30% geringer, als wenn man dies mit einem zweiten Volumen RNase freiem Wasser durchgeführt hätte.

2.5. Qualitätskontrolle der RNA Präparation

Um die Qualität, in diesem Falle also die Konzentration und die Reinheit der Präparation zu kontrollieren und zu protokollieren, wurde eine spektrophotometrische Quantifizierung mit einem Lambda 2 UV/VIS Photometer (Perkin-Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA) durchgeführt. Dazu wurde die Probe der RNA 1:33 mit DEPC behandeltem destilliertem Wasser (ddH₂O) verdünnt. Nach der Hintergrund-Messung wurde die Absorption bei den Wellenlängen A_{260nm}, A_{280nm}, A_{239nm} und

A325nm gemessen. Für die Berechnung der Konzentration wurde die Wellenlänge bei A260nm mit dem Verdünnungsfaktor und 38 (dem Extinktionskoeffizienten für RNA in Wasser) multipliziert. Für die Berechnung der Reinheit wurde der Messwert bei der Wellenlänge A260nm durch den Messwert bei der Wellenlänge bei A280nm geteilt.

2.6. Aliquotierung und Einfrieren

Für die längerfristige Aufbewahrung der Proben bis zu einem Jahr bei -80°C wurde die RNA Präparation in geeigneten Größen aliquotiert (im Schnitt 100µl pro Vial). Die Vials wurden mit der RNA-Bezeichnung, RNA-Menge und deren Konzentration beschriftet und in eine -80°C Truhe überführt.

2.7. Aufreinigung und Konzentrierung der RNA

Es bestand die Möglichkeit bei einer zu geringen Konzentration an RNA diese mittels des RNeasy MiniElute Cleanup Kits (Qiagen GmbH, Hilden, D) aufzureinigen und zu konzentrieren. Das könnte bei zukünftigen Elektroporations- Versuchen mit dendritischen Zellen interessant werden, da für die Elektroporation bestimmte Konzentrationen an RNA wünschenswert sind. Dieses Verfahren wurde versuchsweise angewendet. Das genaue Protokoll entsprach dem des oben beschriebenen RNeasy Maxi Kits mit dem Arbeitsprinzip mit einer Silicagel-Membrane.

2.8. Etablierung/Validierung eines geeigneten Markergens mit herkömmlicher PCR

2.8.1. Die verwendeten Markergene

Es wurden folgende Markergene auf ihre Verwendbarkeit untersucht:

1. Desmoglein 3
2. Survivin
3. EpCAM

Zusätzlich wurde das Strukturprotein Aktin als sogenanntes housekeeping gene (ein Kontrollgen) mitgeführt. Das Gen eignet sich dafür gut, da es praktisch von fast jeder Körperzelle exprimiert wird. Anhand dieser Kontrolle war es möglich, zu überprüfen, ob die PCR an sich funktioniert hat, beziehungsweise ob in allen Reaktionen gleich viel RNA eingesetzt wurde. Es wurden die Primer für die oben erwähnten Gene

(TiBMolBiol, Berlin,D), sowie die humane RNA Polymerase II als housekeeping gene bei ersten Versuchen als Kontrolle eingesetzt. Bei späteren Versuchen wurde auf diese RNA- Polymerase verzichtet. Den Primern wurde nach Herstellerangaben ddH₂O hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Dann wurden sie aliquotiert á 50µl, mit Labels versehen und bei -20°C gelagert. Mehrere Versuche wurden mit den unterschiedlichen Primern und der Tumor-RNA sowie als Referenz auch mit RNA aus menschlicher Haut (BioChain, Hayward, California, USA) durchgeführt.

2.8.2. Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mit dem Omniskript RT Kit (50) (Qiagen GmbH, Hilden, D) und richtete sich nach dem Qiagen Omniskript Reverse Transkription Handbook May 2004. Zunächst wurde ein Master Mix auf Eis hergestellt. Er enthielt alle Komponenten für eine Einzelstrang- Synthese, bis auf die template RNA. Im Einzelnen waren das 10x Puffer RT, dNTP Mix, RNase freies Wasser und die benötigten Primer (nicht im Kit enthalten), sowie die Omniskript Reverse Transkriptase in einer Menge von 4 Units pro 20µl Reaktion. Für die reverse Transkription wurden als Primer ein Oligo(dT)₁₅ und Random (Hexamer) Primers (Promega GmbH, Mannheim, D) verwendet. Der Oligo(dT)₁₅ Primer enthält 15 Thyminbasen, und ist somit komplementär zum Poly(A)-Tail der mRNA. Der Random (Hexamer) Primer enthält 6 zufällig zusammengesetzte Basenpaare. So wurden bei einem Endvolumen von 20µl pro Reaktion von jeder Komponente 2µl benötigt, von der reversen Transkriptase wurde 1µl benötigt. Nachdem die nach dem Handbuch korrekten Volumina Mastermix in die Reaktionsröhrchen gegeben worden waren, wurde die template RNA zugefügt (es wurde mit 2µl gearbeitet, versuchsweise bei der Haut-RNA auch mit 3µl) und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach dem Mischen wurde für 60 min bei 37°C inkubiert, dabei lief dann die reverse Transkription ab. Dies unterscheidet sich von den Bedingungen, die für die auf Seite 8 beschriebene qRT-PCR vom Hersteller gefordert werden. Danach wurden die Röhrchen bei -20°C eingefroren.

2.8.3. Herkömmliche PCR

Nach erfolgter reverser Transkription wurden nun die entstandenen cDNA's einer PCR zur Vervielfältigung unterzogen. Dazu wurde ein HotStarTaq Master Mix (Qiagen GmbH, Hilden, D) benutzt. Er besteht aus 2,5 U HotStarTaq DNA

Polymerase in 1xPCR Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ und 200µM je dNTP. Die PCR erfolgte gemäß HotStarTaq PCR Handbook. Im Einzelnen wurde die erforderliche Menge Master Mix in die Reaktionsgefäße gegeben. Dann wurden die Primer-Mixe hinzugegeben. Diese setzten sich aus den Start und Stop- Primern der oben beschriebenen Markergene zusammen. Anschließend wurde die template cDNA aus den RT-Reaktionen aufgetaut und gemäß dem Protokoll in die Reaktionsgefäße gegeben. Mit RNase-freiem destilliertem Wasser wurden die Gefäße aufgefüllt (zur Beladung der einzelnen Reaktionsgefäße: siehe Tabelle im Anhang). Die befüllten Reaktionsgefäße wurden in einen Thermocycler (Biometra, Göttingen) für die PCR gegeben. Das Gerät war zuvor gemäß Herstellerangaben programmiert worden: Jedes PCR- Programm mußte mit einem initialen Hitzeaktivierungsschritt (95°C für 15min) beginnen. Die Denaturierung (=Aufbrechen des DNA- Doppelstranges) dauerte 30s bei 95°C, die Anlagerung der Primer an die DNA- Sequenzen (=Annealing) bei 55°C (das ist 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer) für 30s, die Extension (=Kettenwachstum) dauerte 1min bei 72°C. Es wurden 35 Zyklen durchlaufen. Daran schloß sich noch eine finale Extension von 10min bei 72°C an. Nach der Amplifikation wurden die Proben über Nacht bei 4°C oder für länger bei -20°C gelagert. Da die gewählte Annealing-Temperatur von großer Bedeutung für die Spezifität der Bindung an die Zielsequenz ist und ganz unterschiedliche Primer benutzt wurden, wurden in anschließenden Versuchen veränderte Werte für die Annealingtemperatur programmiert. Wäre die Temperatur zu niedrig gewesen, wäre es zu unspezifischen Bindungen der Basenpaare gekommen. Die Folge wären unerwünschte Produkte gewesen. Wenn die Temperatur zu hoch gewesen wäre, wäre die Schmelztemperatur der Primer erreicht gewesen. Es wäre kein Produkt entstanden, da die Bindungen zu locker gewesen wären. So wurde die PCR mit Annealingtemperaturen von 55°C für 30s beziehungsweise 45°C für 50s durchgeführt. Die Zyklenanzahl variierte zwischen 35 beziehungsweise 45 Zyklen. Weil der benutzte Thermocycler nicht automatisch eine Quantifizierungsmessung durchführt, mußte mit dem bereits vorgestellten Spektrophotometer quantifiziert werden, um das Ergebnis der PCR zu beurteilen. Es wurden für jede einzelne Probe die DNA- Konzentration und die Reinheit nach den in Kapitel 2.5. vorgestellten Methoden berechnet, mit dem Unterschied, dass jetzt anstelle des Extinktionskoeffizienten für RNA der für DNA in Wasser (=50) verwendet wurde.

2.8.4. Gelelektrophorese

Zur weiteren Charakterisierung der Qualität der DNA wurden Proben aus den einzelnen Wells des PCR- Versuches einer Elektrophorese in 1%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, München, D) unterzogen. Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt, indem 0,5g Agarose (Sigma-Aldrich, München, D) mit 50ml TAE(1x) Puffer (Tris-Acetat-EDTA - Puffer) aufgekocht und, nachdem es auf unter 56°C abgekühlt war, mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt wurde. Dann wurde das Gel in eine Gelkammer gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur polymerisiert. In dem ReadyAgarose Precast Gel System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) wurde die Elektrophorese durchgeführt. Es wurde 1µg der Probe mit dem Ladepuffer Tri-Colour DNA Ladepuffer (Bioline GmbH, Luckenwalde, D) pro Tasche aufgetragen und bei 90V 60min getrennt. Dieser Ladepuffer erlaubte durch seine drei Farben eine genaue Verfolgung der Auftrennung der DNA-Proben während der Elektrophorese. Die blau eingefärbte Bande zeigte eine Produktlänge von 4000bp, die rote eine von 300bp und die gelbe eine von 50bp. Innerhalb dieses Bereiches lagen auch die zu erwarteten Längen der Produkte. Als Größenstandard wurde zunächst die Hyperladder I (Bioline GmbH, Luckenwalde, D) mit einem Arbeitsbereich von 200kb bis 10000kb verwendet. Bei späteren Versuchen kam dann die Hyperladder V (Bioline GmbH, Luckenwalde, D) zum Einsatz. Sie hat einen Arbeitsbereich von 25 bis 500 kb, was besser zu den zu erwarteten Produktlängen passt. Das Gel wurde anschließend unter Beleuchtung mit UV-Licht fotografiert und ausgewertet.

2.9. Etablierung dreier Primerpaare für das Markergen

Nachdem ein geeignetes Markergen gefunden worden war, galt es festzustellen, ob das gesamte Gen vervielfältigt werden konnte. Dazu wurden drei Primerpaare eingesetzt, wie in Kapitel 1.7. beschrieben. Wurde die RNA degradiert, sollten zuerst das 5'-Produkt und dann das 3'-Produkt relativ zum Produkt aus der Gen-Mitte an nachweisbaren Stellen abnehmen. Eine Normalisierung auf das Mittel-Produkt sollte eine Messzahl für die Degradation der RNA ergeben.

Um herauszufinden, welcher Abschnitt der Markergen- DNA nicht denaturiert war, wurden mehrere Sequenzen unterschiedlicher Länge getestet. Am besten wäre es gewesen, wenn das gesamte Gen erhalten gewesen wäre (siehe oben). Daher wurden Start- und Stop- Sequenzen der Primer möglichst weit am Anfang und Ende

der Markergen- DNA gewählt.

2.10. Etablierung der qRT-PCR

2.10.1. Die qRT-PCR

Nachdem die passenden Primersequenzen und Tumor-RNA Proben mit ausreichender, intakter RNA- Menge gefunden waren, konnten qRT-PCR Versuche unternommen werden und diese als Standard-Methode übernommen werden. Für die qRT-PCR wurde ein iCycler (Bio Rad Laboratories GmbH, München, D) benutzt. In diesem laufen die reverse Transkription-Reaktionen zur Umwandlung der RNA in cDNA und die eigentliche PCR zur Vervielfältigung in einer Reaktion ab. Die PCR erfolgte unter Benutzung des Super Script III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, Karlsruhe, D). Zunächst wurde ein Master Mix hergestellt. Er bestand aus dem SYBR Green One-Step Enzyme Mix. Dies wiederum beinhaltet die SuperScript III Reverse Transkriptase für die Herstellung der cDNA und Platinum Taq DNA Polymerase, die während der PCR für ein Kettenwachstum (=Extension) sorgt, sowie einen RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor für die Vermeidung eines RNA Abbau's. Dann wurde der Farbstoff SYBR Green Reaction Mix, sowie Rinder Serum Albumin dem Master Mix hinzugefügt. Letzteres soll eine Bindung einzelner Moleküle, wie der Taq DNA Polymerase an die Oberfläche der Reaktionsgefäße unterbinden. Aufgefüllt wurde der Master Mix mit RNase freiem, destilliertem Wasser. Das Volumen der einzelnen Komponenten entsprach den Herstellerangaben multipliziert mit dem Faktor für die Anzahl der Reaktionen beziehungsweise Proben. Zur Durchführung der qRT-PCR wurden die einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden, D) mit den verschiedenen Primer-Paaren und einer Master-Mix-Lösung, die die einzelnen oben beschriebenen Reaktionskomponenten enthielt, beladen. Dies folgte dem Protokoll des Herstellers. Es wurden so mehrere Felder der Mikrotiterplatte beladen, so dass jetzt RNA aus unterschiedlichen Präparationen gleichzeitig verwendet werden konnte. Dabei wurde jede RNA- Probe mit allen zur Verfügung stehenden Primern getestet. Die Wells wurden anschließend mit destilliertem, RNase freiem Wasser aufgefüllt. (siehe hierzu Tabelle 2 im Anhang) Nach einer Zentrifugation für 1min bei 1000xg wurde die Platte in den iCycler gestellt. Dieser wurde nach Herstellerempfehlungen wie folgt programmiert: 50°C für 30min (cDNA Synthese), 95°C für 5min (hot start-Polymerase-Aktivierung), 40 Zyklen je 95°C für 30s (Denaturierung), 55°C für 45s (Annealing), zum Schluß 40°C für

1min. Die Ergebnisse wurden gesammelt und analysiert. Nach der erfolgten qRT-PCR wurden die Proben in der Platte bei -20°C gelagert.

2.10.2. Gelelektrophorese nach qRT-PCR

Die Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel 2.8.4. beschrieben durchgeführt.

2.10.3. Validierung mittels künstlicher Degradierung der RNA

Es wurde die Resistenz der Tumor-RNA, gegen RNasen untersucht. Dafür wurden ganz allgemeine und nicht näher untersuchte Verunreinigungen benutzt. Im Einzelnen wurde ein Aliquot einer Tumor-RNA aufgetaut und 15µl in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf-Cup) gegeben, welches zuvor mit einem durch einen angeleckten Finger kontaminierten Wattestäbchen ausgewischt worden war. Das Röhrchen wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden fünf Röhrchen kontaminiert. Sie wurden ebenfalls bei 37°C in den Inkubator gestellt. Nun wurden jeweils 15µl der gleichen RNA mit 15 Minuten Abstand in die Gefäße gegeben. Nach der letzten Befüllung wurden alle Gefäße inklusive des „über Nacht-Gefäßes“ und eines Gefäßes mit nicht kontaminierter RNA als Kontrolle auf Eis gestellt und die qRT-PCR gestartet (siehe hierzu Tabelle 3 im Anhang).

Zusätzlich wurden auch Versuche mit RNase-haltigem Puffer anstelle des „angeleckten Fingers“ unternommen. Dazu wurden die Röhrchen vorher mit 10µl des Puffers befüllt. Dieser Puffer wurde hergestellt aus 1,5mg RNase A aus dem NucleoBond Xtra Maxi Plus Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) in 1ml PBS gelöst.

2.10.4. Validierung mittels RNA-Verdünnungsreihe

Zusätzlich zu der Degradierung der RNA wurde noch eine Verdünnungsreihe der RNA hergestellt und diese parallel zu der RNA-Degradierung der qRT-PCR unterzogen. Die Verdünnungsreihe reichte bis zu einer Verdünnung von 1:64 in sechs RNase-freien Röhrchen mit einem Volumen von je 30µl. Die RNA wurde mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Mit diesem Versuch galt es herauszufinden, inwieweit das Verfahren von der Konzentration der RNA abhängig ist.

2.11. Anhang zum Material und Methoden- Teil

Bez.	Sequence	Gen	Acc.#	mer	OD	S.am	S.durch	Lotnr.	Menge: [nmol]	TM (Hersteller)	TM (Primer- software)	Annealing: T (PCR)	GC geh.	für 10 µM löse in ddH2O	Aliquot: am	Aliq: Von	Konz.d. Aliquots [µM]
ActinL	gACgAggCCCgAgCAgAg	Actin		20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709860	4,2	61,10°C		66,00°C	65,00%	420 µl			10,00
ActinR	ATCTCCTTCTgCATCTgTc	Actin		20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709861	5,6	52,30°C		60,00°C	50,00%	560 µl			10,00
DGL3str15'	cggtcacttggaacttttc	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	14.07.05	TIB Molbio	635675	5,3	56,50°C	59,85°C	65,30°C	50,00%	530 µl	28.09.2005	SP	10
DGL3str13'	ctccttctctgagggtttg	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	14.07.05	TIB Molbio	635676	5,4	56,70°C	59,98°C	65,40°C	55,00%	540 µl	28.09.2005	SP	10
DGL3mid5'	tcaacccagctcacaattca	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	14.07.05	TIB Molbio	635677	4,8	55,30°C	59,94°C	64,00°C	45,00%	480 µl	28.09.2005	SP	10
DGL3mid3'	tgacatttgaggcagctttg	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	14.07.05	TIB Molbio	635678	4,7	55,90°C	59,99°C	64,60°C	45,00%	470 µl	28.09.2005	SP	10
DGL3stop5'	actgcaggctttgatccact	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	14.07.05	TIB Molbio	635679	5,0	56,90°C	59,87°C	65,60°C	50,00%	500 µl	28.09.2005	SP	10
DGL3stop3'	tccagatttgctcagtggtg	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	14.07.05	TIB Molbio	635680	4,8	55,20°C	59,52°C	64,00°C	50,00%	480 µl	28.09.2005	SP	10
DGL3mid3'2	gtcctcatcgatggtctgat	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	12.10.05	TIB Molbio	659002	5,0	54,90°C	60,04°C	63,70°C	50,00%	500 µl			10
DGLstr15'2	caaacctgcagagaaggag	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	12.10.05	TIB Molbio	659003	4,2	56,70°C	59,98°C	65,40°C	55,00%	420 µl			10
DGLstr13'2	cccactccagatctcgta	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	12.10.05	TIB Molbio	659004	4,8	55,70°C	60,07°C	64,50°C	55,00%	480 µl			10
DGLend5'2	tcagaagcatttgctctg	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	12.10.05	TIB Molbio	659005	4,7	55,90°C	59,99°C	64,60°C	45,00%	470 µl			10
DGLend3'2	acaggagaaccagtgcatc	Desmoglein 3	NM_001944	20	1,0	12.10.05	TIB Molbio	659006	4,4	56,60°C	60,12°C	65,30°C	55,00%	440 µl			10
hSurv_1.AL	gcattgggtgccccagcgttg	Survivin	NM_001168	20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709873	5,0	69,30°C		73,21°C	70,00%	496 µl			9,92
hSurv_1.AR	gctccggccagagggcctcaa	Survivin	NM_001168	20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709874	4,9	67,40°C		71,35°C	70,00%	488 µl			9,96
hSurv_3.AL	cgaccccatagaggaacataaa	Survivin	NM_001168	22	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709875	3,9	55,90°C		60,20°C	45,45%	386 µl			9,90
hSurv_3.AR	ggaataaacctcggagtgggtg	Survivin	NM_001168	22	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709876	3,9	58,30°C		61,80°C	50,00%	388 µl			9,95
Epcam_3.AL	ggacctgacagtaaatggggaaac	EpCAM	NM_002354	23	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709862	3,7	59,30°C	62,99°C	52,17%		368 µl	12.04.2006	SP	9,95
Epcam_3.AR	ctcttcttctggaataaccagcac	EpCAM	NM_002354	26	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709863	3,8	59,10°C	62,74°C	42,31%		380 µl	12.04.2006	SP	10,00
EpCAM_1.1L	gctcctctgtgtcccactc	EpCAM	NM_002354	18	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709864	6,4	55,90°C	59,31°C	66,67%		636 µl	03.05.2006	SP	9,94
EpCAM_1.1R	acggccagcttgtagttttc	EpCAM	NM_002354	20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709865	5,0	56,90°C	59,38°C	50,00%		502 µl	03.05.2006	SP	10,04
EpCAM_1.2R	gcaagcagaagcccgaac	EpCAM	NM_002354	18	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709866	4,8	58,70°C	62,05°C	61,11%		480 µl	03.05.2006	SP	10,00
EpCAM_2.1L	gctggtgtggaacactgct	EpCAM	NM_002354	20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709867	4,8	57,40°C	59,95°C	55,00%		482 µl	03.05.2006	SP	10,04
EpCAM_2.1R	acgcgttgtagctcctctc	EpCAM	NM_002354	20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709868	5,3	56,50°C	59,87°C	50,00%		532 µl	03.05.2006	SP	10,04
EpCAM_2.2L	gctctgagcagtgagaacc	EpCAM	NM_002354	20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709869	4,5	56,60°C	60,29°C	60,00%		454 µl	03.05.2006	SP	10,09
EpCAM_3.1L	gcagggtctaaaagctggtg	EpCAM	NM_002354	20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709870	4,4	57,00°C	59,88°C	55,00%		442 µl	03.05.2006	SP	10,05
EpCAM_3.1R	ccacgcacacacatttgtaa	EpCAM	NM_002354	20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709871	4,7	55,50°C	59,04°C	45,00%		468 µl	03.05.2006	SP	9,96
EpCAM_3.2L	gatgggtgagatgcataggg	EpCAM	NM_002354	20	1,0	29.03.06	Tib Molbio	709872	4,2	55,30°C	60,30°C	55,00%		422 µl	03.05.2006	SP	10,05
EpCAM_1.3L	ggctcctgtgtcccactcc	EpCAM	NM_002354	20	1,0	26.05.06	Tib Molbio	727695	5,7	63,00°C	66,70°C	70,00%		570 µl			10,00
EpCAM_1.3R	cctgagctgcccgaaaagtc	EpCAM	NM_002354	20	1,0	26.05.06	Tib Molbio	727696	4,6	62,30°C	65,58°C	60,00%		464 µl			10,09
EpCAM_1.4L	cgccgagcagcacccttcgac	EpCAM	NM_002354	21	1,0	26.05.06	Tib Molbio	727697	4,6	69,90°C	65,00°C	71,40%		458 µl			9,96
EpCAM1.4Rs	agcagtttacggccagcttgattttcac	EpCAM	NM_002354	30	1,0	26.05.06	Tib Molbio	727698	3,2	67,70°C		46,70%		324 µl			10,13
EpCAM_1.5L	cgctgcccggccggctc	EpCAM	NM_002354	17	1,0	26.05.06	Tib Molbio	727699	6,6	71,50°C	64,00°C	88,20%		656 µl			9,94
EpCAM_1.5R	cagcttgtagttttcagacac	EpCAM	NM_002354	23	1,0	26.05.06	Tib Molbio	727700	4,2	53,70°C	66,00°C	43,50%		416 µl			9,90
EpCAM_1.6L	tacaagctggccgtaaacctg	EpCAM	NM_002354	20	1,0	26.05.06	Tib Molbio	727701	4,5	56,10°C	58,99°C	50,00%		454 µl			10,09
EpCAM_1.6R	tgcttcatcaccaaacatt	EpCAM	NM_002354	20	1,0	26.05.06	Tib Molbio	727702	4,9	54,70°C	58,98°C	40,00%		494 µl			10,08
EpCAM_1.4R	aaagcatttacggccagcttgattttcac	EpCAM	NM_002354	32	1,0	26.05.06	Tib Molbio										#DIV/0!

Tabelle 1: Sequenzen und Eigenschaften der verwendeten Primerpaare
Jeweils zwei untereinander stehende Primer bilden ein Primerpaar.

Komponente	¹ PCR-Rxn1 Wasserkontrolle	² PCR-Rxn2 Aktin-Kontrolle	³ PCR-Rxn3 Aktin-Kontrolle	⁴ PCR-Rxn4 Aktin-Kontrolle
HotStarTaq Master Mix ¹	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Primer A	2 µl AktinL	2 µl AktinL	2 µl AktinL	2 µl AktinL
Primer B	2 µl AktinR	2 µl AktinR	2 µl AktinR	2 µl AktinR
Dest. Wasser	21 µl	19 µl	19 µl	19 µl
Template cDNA ²	-	2 µl RT-Rxn1	2 µl RT-Rxn2	2 µl RT-Rxn3
Endvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Produktlänge	0	785 (1320)	785 (1320)	785 (1320)

Komponente	⁵ PCR-Rxn5 Wasserkontrolle	⁶ PCR-Rxn6 EpCAM 3.A	⁷ PCR-Rxn7 EpCAM 3.A	⁸ PCR-Rxn8 EpCAM 3.A
HotStarTaq Master Mix	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Primer A	2 µl Epcam 3.AL	2 µl Epcam 3.AL	2 µl Epcam 3.AL	2 µl Epcam 3.AL
Primer B	2 µl Epcam 3.AR	2 µl Epcam 3.AR	2 µl Epcam 3.AR	2 µl Epcam 3.AR
Dest. Wasser	21 µl	19 µl	19 µl	19 µl
Template cDNA	-	2 µl RT-Rxn1	2 µl RT-Rxn2	2 µl RT-Rxn3
Endvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Produktlänge	0	186	186	186
Komponente	⁹ PCR-Rxn9 Wasserkontrolle	¹⁰ PCR-Rxn10 hSurv1.A	¹¹ PCR-Rxn11 hSurv1.A	¹² PCR-Rxn12 hSurv1.A
HotStarTaq Master Mix	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Primer A	2 µl hSurv1.AL	2 µl hSurv1.AL	2 µl hSurv1.AL	2 µl hSurv1.AL
Primer B	2 µl hSurv1.AR	2 µl hSurv1.AR	2 µl hSurv1.AR	2 µl hSurv1.AR
Dest. Wasser	21 µl	19 µl	19 µl	19 µl
Template cDNA	-	2 µl RT-Rxn1	2 µl RT-Rxn2	2 µl RT-Rxn3
Endvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Produktlänge	0	447	447	447

Komponente	¹³ PCR-Rxn13 Wasserkontrolle	¹⁴ PCR-Rxn14 hSurv3.A	¹⁵ PCR-Rxn15 hSurv3.A	¹⁶ PCR-Rxn16 hSurv3.A
HotStarTaq Master Mix	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Primer A	2 µl hSurv3.AL	2 µl hSurv3.AL	2 µl hSurv3.AL	2 µl hSurv3.AL
Primer B	2 µl hSurv3.AR	2 µl hSurv3.AR	2 µl hSurv3.AR	2 µl hSurv3.AR
Dest. Wasser	21 µl	19 µl	19 µl	19 µl
Template cDNA	-	2 µl RT-Rxn1	2 µl RT-Rxn2	2 µl RT-Rxn3
Endvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Produktlänge	0	276	276	276

Tabelle 2: Zusammenstellung der Reaktionen mit HotStarTaq Master Mix. Die Tabelle zeigt exemplarisch ein Schema zur Beladung der Reaktionsgefäße bei der herkömmlichen PCR zur Markergen-Suche. Es wurden die verschiedenen Primer für die jeweiligen Genabschnitte für die Markergene EpCAM und Survivin verwendet. Als Kontrolle wurde Aktin eingesetzt. Es wurden cDNA's aus drei verschiedenen Tumorproben eingesetzt, die zuvor mithilfe der reverse Transkription hergestellt wurden. Von EpCAM wurde nur ein Genabschnitt und von Survivin nur zwei Genabschnitte, nicht drei (wie in der Arbeitshypothese unter Kapitel 1.6. gefordert), da es hier zunächst nur um die Markergen etablierung, nicht um die Primer etablierung ging. Vorherige Versuche mit Desmoglein führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen, so dass dieses Gen als Markergen ausschied.

¹ 2,5 U HotStarTaq DNA Polymerase in 1xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂ und je 200µM je dNTP.

² Template cDNA: Bis zu 2µg (pro 20µl Reaktion).

Komponente	Menge	Rxn1 Wasserkontrolle	Rxn2 EpCAM 3.A
SYBR Green One-Step Enzyme Mix	1 µl	42 µl EpCAM 3A-Mix (Epcam 3.AL, Epcam 3.AR)	42 µl EpCAM 3A-Mix (Epcam 3.AL, Epcam 3.AR)
2x SYBR Green Reaction Mix	25µl		
Primer A, 10 µM	1µl		
Primer B, 10 µM	1µl		
dest. Wasser	14µl		
RNA		8 µl Wasser	8 µl "0" RNA
Endvolumen		50 µl	50 µl
Produktlänge		0	186

Komponente	Menge	Rxn3 EpCAM 1	Rxn4 EpCAM 2	Rxn5 EpCAM 3
SYBR Green One-Step Enzyme Mix	1 µl	42 µl EpCAM 1-Mix (Epcam 1.6L, Epcam 1.6R)	42 µl EpCAM 2-Mix (Epcam 2.2L, Epcam 2.2R)	42 µl EpCAM 3-Mix (Epcam 3.2L, Epcam 3.2R)
2x SYBR Green Reaction Mix	25µl			
Primer A, 10 µM	1µl			
Primer B, 10 µM	1µl			
Dest. Wasser	14µl			
RNA		8 µl "0" RNA	8 µl "0" RNA	8 µl "0" RNA
Endvolumen		50 µl	50 µl	50 µl
Produktlänge		120	116	104

Komponente	Menge	Rxn6 EpCAM 1	Rxn7 EpCAM 2	Rxn8 EpCAM 3
SYBR Green One-Step Enzyme Mix	1µl	42 µl EpCAM 1-Mix (Epcam 1.6L, Epcam 1.6R)	42 µl EpCAM 2-Mix (Epcam 2.2L, Epcam 2.2R)	42 µl EpCAM 3-Mix (Epcam 3.2L, Epcam 3.2R)
2x SYBR Green Reaction Mix	25µl			
Primer A, 10 µM	1µl			
Primer B, 10 µM	1µl			
Dest. Wasser	14µl			
RNA		8 µl „5" RNA	8 µl „5" RNA	8 µl „5" RNA
Endvolumen		50 µl	50 µl	50 µl
Produktlänge		120	116	104

Tabelle 3: Ausschnitt aus: Zusammenstellung der Reaktionen zur Beladung der Mikrotiterplatte für die qRT-PCR bei RNA-Degenerationsversuch

Diese Tabelle steht exemplarisch (was die Mengenangaben betrifft) für ein Schema der Beladung einer Mikrotiterplatte bei qRT-PCR Versuchen mit den etablierten Primern. Im Speziellen zeigt die Tabelle die Beladung bei einem Degenerationsversuch. „5"RNA bedeutet, dass sich die RNA 5 Minuten in der RNase A befand, bevor sie in die Reaktionsgefäße gegeben wurde (siehe Text, Kapitel 2.10.3.). Weitere Wells der Titerplatte wurden mit den gleichen Komponenten, sowie mit der „10"RNA, „30"RNA, „60"RNA, „120"RNA und der „über Nacht"RNA nach dem gleichen Schema beladen (in der Tabelle nicht gezeigt)

Der Einfachheit halber wurden die Primerpaare mit dem SYBR Green One-Step Enzyme Mix und dem 2x SYBR Green Reaction Mix zuvor gemischt und dann aus diesem Mix die entsprechende Menge entnommen.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, ein Messverfahren zu entwickeln, das eine quantitative Aussage zum Zustand der RNA ermöglichte, um so eine Qualitätskontrolle der Tumor RNA bei Transfektionsversuchen an dendritischen Zellen zu realisieren. Bezugnehmend auf die Arbeitshypothese wurden mittels quantitativer PCR drei Primerpaare eines geeigneten Markergens etabliert. Dieses Verfahren wurde mittels RNA-Verdünnungsreihe und künstlicher Degradierung validiert.

3.1. Etablierung der Probenaufarbeitung (RNA-Gewinnung aus Tumoren)

Insgesamt wurde aus 23 Gewebeproben mit dem beschriebenen Verfahren Tumor-RNA extrahiert. In den meisten Fällen erfolgte einen Tag nach der Probenentnahme die RNA- Gewinnung. Die längste Zeit zwischen der Entnahme und der Aufbereitung waren 12 Tage. Die Lagerbedingungen mit RNA Later wurden eingehalten. Das Gewicht der Tumorproben schwankte zwischen 50 und 2481mg. Dabei lag das mittlere Gewicht bei 464mg. Die Homogenisierung mit dem Rotor-Stator-Homogenisierer führte zu einem guten Aufschluss des Gewebes, allerdings verblieben kleinere Gewebereste. Diese wurden nicht dem weiteren Isolationsprozess unterzogen. Die Isolierung der RNA mit dem RNeasy Maxi Kit war in den meisten Fällen problemlos möglich. Die spektroskopische Quantifizierung mittels des Lambda 2 UV/VIS Photometers ergab die aus den Absorptionwerten bei der Wellenlänge A260nm errechneten Werte für die RNA- Konzentration und aus dem Quotienten der Messergebnisse bei A260nm/A280nm. Die Werte sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Nr.	Tumor-Resektion, Transfer in RNA Later am	Lager-temperatur [°C]	Gewicht der Tumor-Probe [mg]	RNA extrahiert am	Extraktions-methode	RNA Menge [µg]	RNA Konzentration [µg/µl], Reinheit	Anzahl der Aliquots	Größe der Aliquots [µl]	Konz. in Aliquots [µg/µl]	Tumorgehalt lt. Pathologie
1	14/ Mär/05	4	725	15/ Mär/05	Rneasy MaxiKit	0,00	0,00 0,00	0	0,00	0,00	n.bek.
2	17/ Mär/05	4	50	18/ Mär/05	Rneasy MaxiKit	30,00	0,05 1,64	1	600,00	0,05	n.bek.
3	12/ Apr/ 05	4	139	14/ Apr/ 05	Rneasy MaxiKit	0,00	0,00 0,00	0	0,00	0,00	n.bek.
4	14/ Apr/ 05	4	142	15/ Apr/ 05	Rneasy MaxiKit	159,84	1,08 1,51	16	9,25	1,08	80%
5	18/ Apr/ 05	4	208	20/ Apr/ 05	Rneasy MaxiKit	187,20	0,18 1,74	13	80,00	0,18	80%
6	29/ Apr/ 05	4	2481	6/ Mai/ 05	Rneasy MaxiKit	0,00	0,00 0,00	0	0,00	0,00	95%
7	9/ Mai/ 05	4	392	11/ Mai/ 05	Rneasy MaxiKit	875,00	1,25 1,75	7	100,00	1,25	90%
8	gleiche Probe	gleiche Probe	gleiche Probe	gleiche Probe	Rneasy MiniKit	33,5	0,67 1,75	1	50,00	0,67	90%
9	17/ Mai/ 05	4	295	19/ Mai/ 05	Rneasy MaxiKit	707,20	1,04 1,75	7	6x100, 1x80	1,04	80-90%
10	19/ Mai/ 05	4	251	24/ Mai/ 05	Rneasy MaxiKit	435,00	0,62 1,72	7	100,00	0,62	50%
11	2/ Jun/ 05	4	216	5/ Jun/ 05	Rneasy MaxiKit	704,00	0,88 1,74	8	100,00	0,88	80%
12	27/ Jun/ 05	4	187	1/ Jul/ 05	Rneasy MaxiKit	518,40	0,72 1,76	9	80,00	0,72	50-60%
13	4/ Jul/ 05	4	183	5/ Jul/ 05	Rneasy MaxiKit	259,20	0,36 1,36	8	90,00	0,36	0%
14	19/ Jul/ 05	4	131	23/ Jul/ 05	Rneasy MaxiKit	306,60	0,42 1,75	8	7x100, 1x30	0,42	90%
15	21/ Jul/ 05	4	148	24/ Jul/ 05	Rneasy MaxiKit	488,00	0,61 1,76	8	100,00	0,61	0%
16	21/ Nov/05	20	272	22/ Nov/ 05	Rneasy MaxiKit	515,04	0,70 1,63	8	7x100, 1x40	0,70	n.bek.
17	13/ Dez/05	20	848	14/ Dez/ 05	Rneasy MaxiKit	0,00	0,00 0,00	0	0,00	0,00	n.bek.
18	19/ Jan/ 06	4	311	24/ Jan/ 06	Rneasy MaxiKit	523,41	0,72 1,71	8	7x100, 1x30	0,72	20%
19	26/ Jan/ 06	4	187	7/ Feb/ 06	Rneasy MaxiKit	412,56	0,57 1,72	8	7x100, 1x20	0,57	70%
20	22/ Mär/06	20	329	23/ Mär/06	Rneasy MaxiKit	123,90	0,18 1,83	1	123,90	0,18	5-10%
21	31/ Mär/06	4	141	5/ Apr/ 06	Rneasy MaxiKit	22,40	0,03 1,13	1	22,40	0,03	70%
22	6/ Jun/ 06	4	211	12/ Jun/ 06	Rneasy MaxiKit	286,00	0,40 1,78	8	7x100, 1x15	0,40	n.bek.
23	30/Jun/06	20	904	30/Jun/06	Rneasy MaxiKit	n.bek.	n.bek.	19	5x20,1x30, 1x50, 12x100	n.bek.	n.bek.
24	06/Jul/06	4	210	12/Jul/06	Rneasy MaxiKit	n.bek.	n.bek.	11	6x100, 5x20	n.bek.	n.bek.

Tabelle 4: RNA- Gewinnung aus den einzelnen Gewebeprobe

Eine ideale RNA- Konzentration für die Beladung von dendritischen Zellen liegt bei 1µg/µl. Da die Konzentrationen der gewonnenen Proben teilweise davon abweichen, wurde der Einsatz des RNeasy MiniElute Cleanup Kits (Qiagen GmbH, Hilden, D) erprobt, wie der Versuch mit der Probe vom 09.05.05. So hatte man die Möglichkeit,

die Proben aufzureinigen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gewonnene RNA in 18 Proben mit einer Konzentration von 0,03µg/µl bis 1,25µg/µ vorlag. Die Proben Nummer 23 und 24 waren Heilversuche an Patienten, bei denen die Konzentration der gewonnenen RNA direkt nach dem Auftauen eines Vials bestimmt werden sollte. Dazu kam es aber nicht, die Heilversuche wurden von klinischer Seite abgebrochen. Die Proben Nummer 1, 3, 6 und 17 wurden verworfen, da bei diesen Versuchen Verfahrensfehler auftraten, weil keine RNA isoliert wurde.

3.2. Etablierung/ Validierung des Markergens mittels herkömmlicher PCR an Tumoren

Nach erfolgter reverse Transkription wurde eine herkömmliche PCR durchgeführt. Zur Überprüfung der Qualität der gewonnenen Proben, beziehungsweise um das beste Markergen herauszufinden, wurden Proben aus den einzelnen Wells des PCR-Versuches einer Elektrophorese in 1%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, München, D) unterzogen. Zunächst wurden Versuche mit dem Gen Desmoglein 3 unternommen und diese zusammen mit dem Gen Aktin als Kontrolle durchgeführt. Dieses wurde als sogenanntes housekeeping gene mitgeführt. Anhand dieser Kontrolle war es möglich, zu überprüfen, ob die PCR an sich funktioniert hat, beziehungsweise, ob in allen Reaktionen gleich viel RNA eingesetzt wurde. Fotografische Auswertungen der Gelelektrophoresen sind in Abbildung 4 bis 6 zu sehen. Für die aus den hier benutzten Primerpaaren resultierenden PCR-Produkten werden folgende Größen erwartet:

Aktin: #12 ACTMRH_V' (β-Aktin) / #13 ACTMRH_R (β-Aktin): 785bp (1320bp mit Exons)

Desmoglein 3: DGL3stop5' / DGL3stop3': 197bp

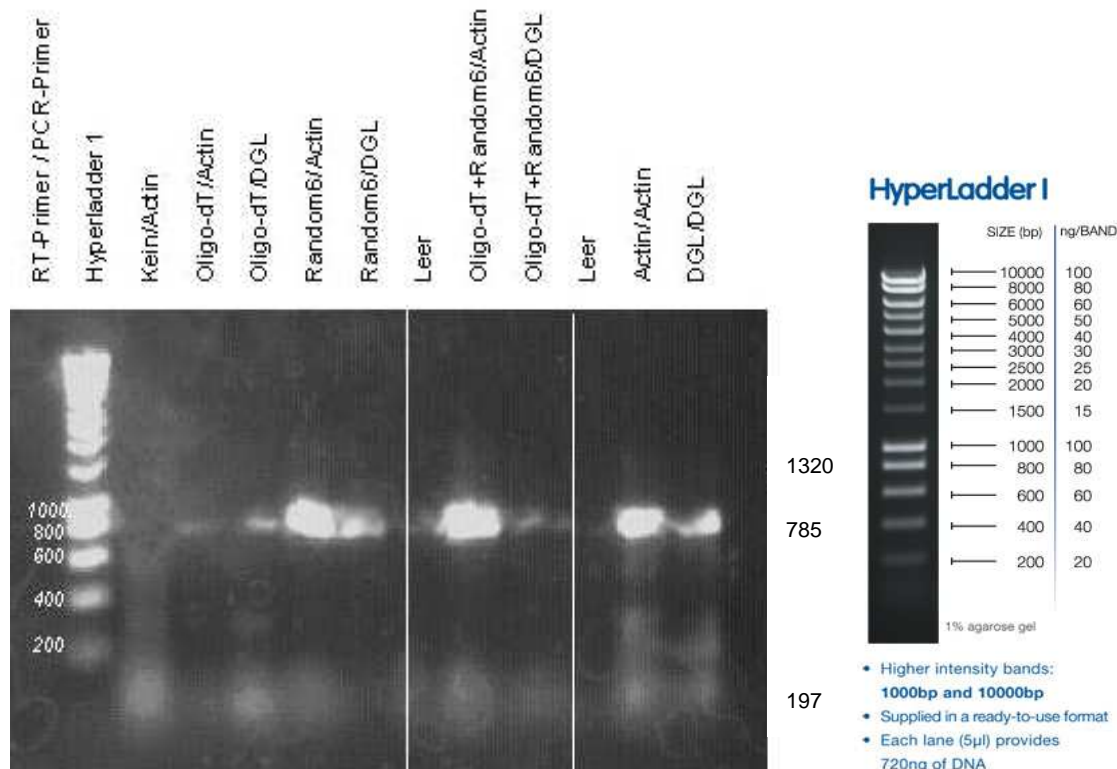


Abbildung 4: Fotografische Auswertung der Gelelektrophorese bei der Markergen-Suche mit Desmoglein 3

Die zu erwartenden Produktlängen wurden in die Abbildung eingefügt. Als Größenstandard wurde die 10000bp Standard Hyperladder 1 (Bioline) verwendet. „Oligo-dT“ und „Random6“ sind die Namen der RT-Primer. Die Primer für die PCR sind in diesem Fall die oben erwähnten Primer für Aktin und Desmoglein.

Abbildung 5: Der Arbeitsbereich der Hyperladder I, www.bioline.com

Um die cDNA herzustellen, wurden hier die unspezifischen Primer Random6 Hexamers und Oligo-dT-Primer eingesetzt (wie in Kapitel 2.8.2. beschrieben). Während der PCR wurden durch speziell entwickelte Primer (wie in Kapitel 2.8.3. beschrieben) Genabschnitte der Gene Aktin und Desmoglein 3 amplifiziert. Aus den Abbildungen 4 und 5 wird ersichtlich, dass der Oligo-dT Primer allein zu keinem Ergebnis führte. Ein besseres Ergebnis lieferten beide RT-Primer in Kombination, wie es bei der Aktin-Kontrolle mit den beiden Primern zu sehen ist. Hier gab es eine deutliche Bande bei 785bp. Das entspricht auch der zu erwartenden Produktlänge. Außerdem wurde aus dem Versuch gefolgert, dass das Gen Desmoglein3 als Markergen nicht in Frage kommt, da es weder mit den RT-Primern in einzelnen Versuchen noch mit beiden RT-Primern zusammen zu zuverlässig guten Produkten bei der PCR kam. Das ist daran zu sehen, dass es keine deutliche Bande bei 137bp

(die erwartete Länge des Produktes) gab. Dies bedeutet, dass in dieser Probe kein Produkt mit dieser Länge hergestellt wurde. Als nächstes wurden die Gene EpCAM und Survivin vergleichend wieder mit Aktin untersucht. Die Ergebnisse stellen die Abbildungen 6 und 7 dar.

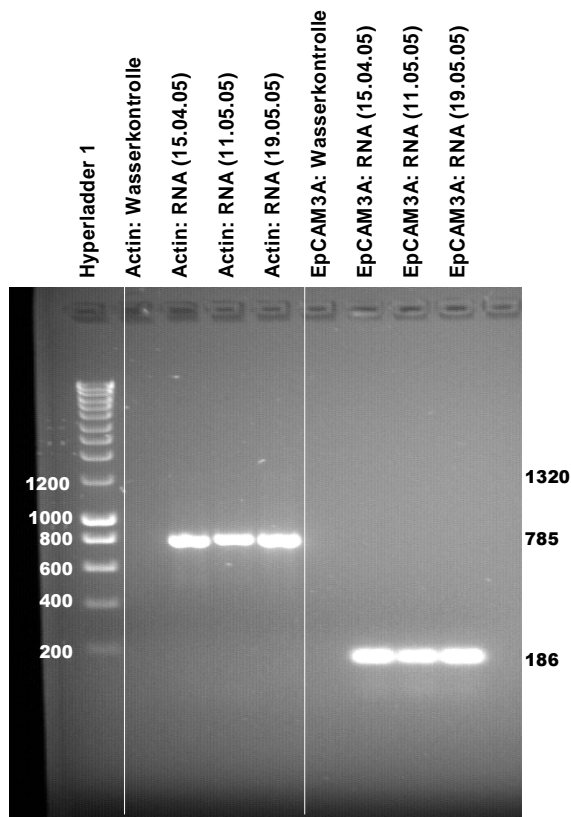


Abbildung 6:
Fotographische Auswertung der Gelelektrophorese mit spezifischen Primern für Aktin und EpCAM

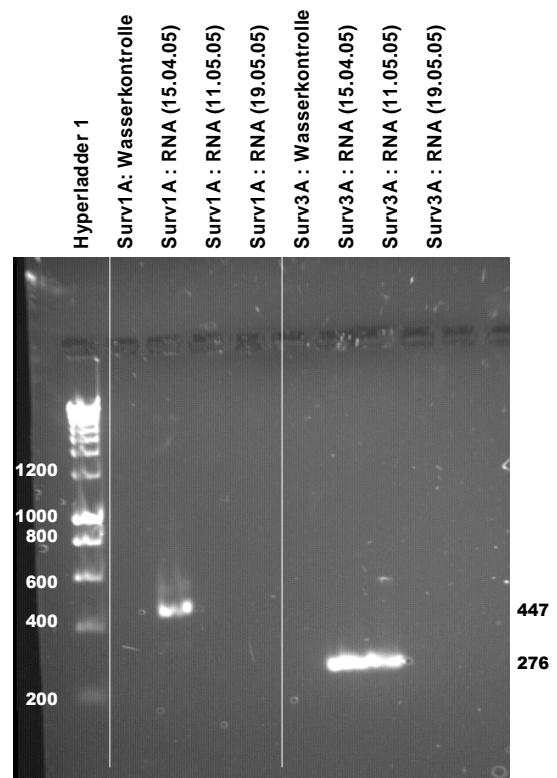


Abbildung 7:
Fotographische Auswertung der Gelelektrophorese mit spezifischen Primern für Survivin

Bei diesen Versuchen wurden drei verschiedene Tumor-RNA-Proben gleichzeitig untersucht. Bei der RT-Reaktion wurden Oligo-dT und Random6-Primer zusammen verwendet, da dies vorher zu guten Ergebnissen geführt hatte. Die photographische Auswertung zeigt bei allen drei Tumorproben ein positives Ergebnis für Aktin. Das bedeutet, dass die PCR gut funktioniert hat, da Aktin ja das Kontroll-Gen darstellt. Des Weiteren ist bei der Aktin-PCR bei allen drei Tumoren keine Bande bei 1320bp zu sehen, was ein Merkmal dafür ist, dass keine Kontamination genomischer DNA vorlag. Wenn es zu einer Kontamination während der RNA-Präparation gekommen wäre, würden die Aktin-Primer von der Kontamination ein Produkt amplifizieren, das auch noch ein Intron enthält und 1320bp lang ist. Alle drei Tumore exprimierten

EpCAM-RNA. Damit scheint EpCAM ein brauchbares Markergen zu sein.

Für Survivin fiel das Ergebnis nicht so klar aus. So amplifizierte der Surv1A Primer nur aus einem Tumor (RNA, 15.04.05) und der Surv3A Primer nur aus zwei Tumoren (RNA, 15.04.05 und RNA, 11.05.05). Aufgrund des deutlichen Ergebnisses fiel die Entscheidung für ein geeignetes Markergen auf das Gen EpCAM.

3.3. Etablierung dreier Primerpaare für EpCAM mit herkömmlicher PCR

Nach der Etablierung des Markergens mussten drei geeignete Primerpaare für EpCAM gefunden werden, um das Verfahren zu validieren. Wie bereits in Kapitel 1.7. beschrieben, sollte dieser Schritt ein intaktes Gen in voller Länge nachweisen. Dazu wurden herkömmliche PCR-Versuche mit speziell hergestellten Primern unternommen. Dabei wurde versucht, das Primerpaar für den Anfang der Gensequenz so weit wie möglich an den Beginn der Sequenz zu legen und das Primerpaar für das Ende der Gensequenz so weit wie möglich an den Schluss der Sequenz zu legen. Das dritte Primerpaar diente, wie in Kapitel 2.9. beschrieben, als Messzahl für die Degradation der RNA. Die dabei getesteten Primersequenzen sind der Tabelle 1 in Kapitel 2.11. zu entnehmen. Wo sich diese Sequenzen auf dem Gen genau befinden, zeigt Abbildung 8. Es wurde jetzt auch ein neuer Größenstandard, die Hyperladder V, verwendet, da ihr Arbeitsbereich (siehe Abbildung 9) genauer zu den zu erwartenden Produktlängen passt. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich wird, wurden nicht bei allen Primerpaaren positive Ergebnisse gefunden. Daher wurden die Versuche wiederholt, um eventuelle Fehler auszuschließen. Des Weiteren wurden andere Primerpaare untersucht, die immer ein Stück weiter zur Mitte des Gens gelegt wurden, bis schließlich Primerpaare gefunden wurden, die verlässliche Ergebnisse lieferten. Diese Vorgehensweise führte dazu, dass das Gen von den Enden her immer weiter eingegrenzt wurde.

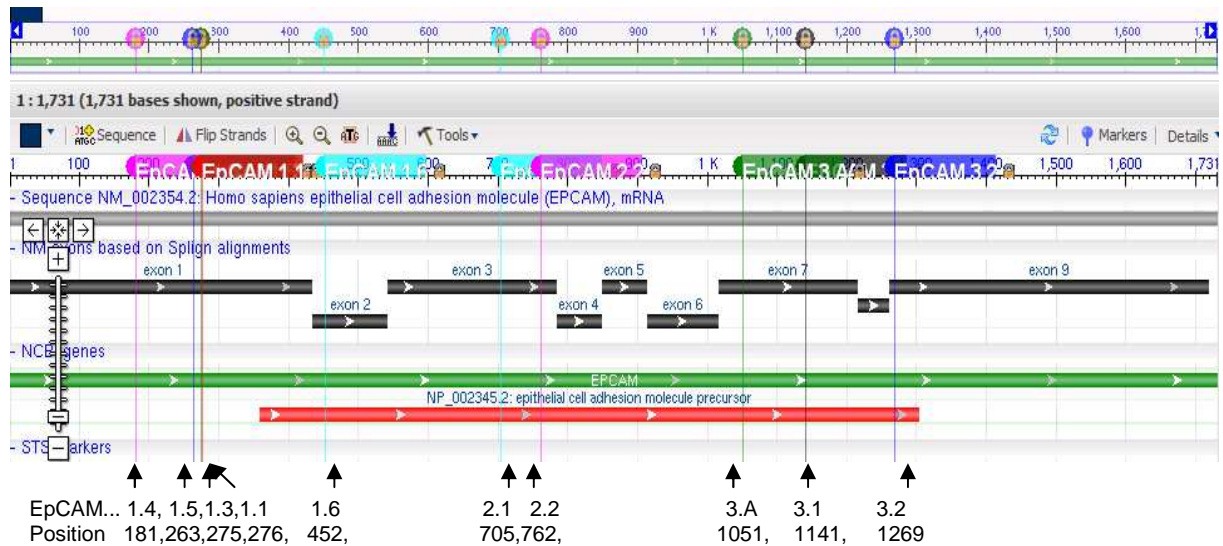


Abbildung 8: Positionen der getesteten Primersequenzen auf dem EpCAM Gen, www.ncbi.nlm.nih.gov

Die Basen des Gens werden ab dem Beginn durchnummeriert

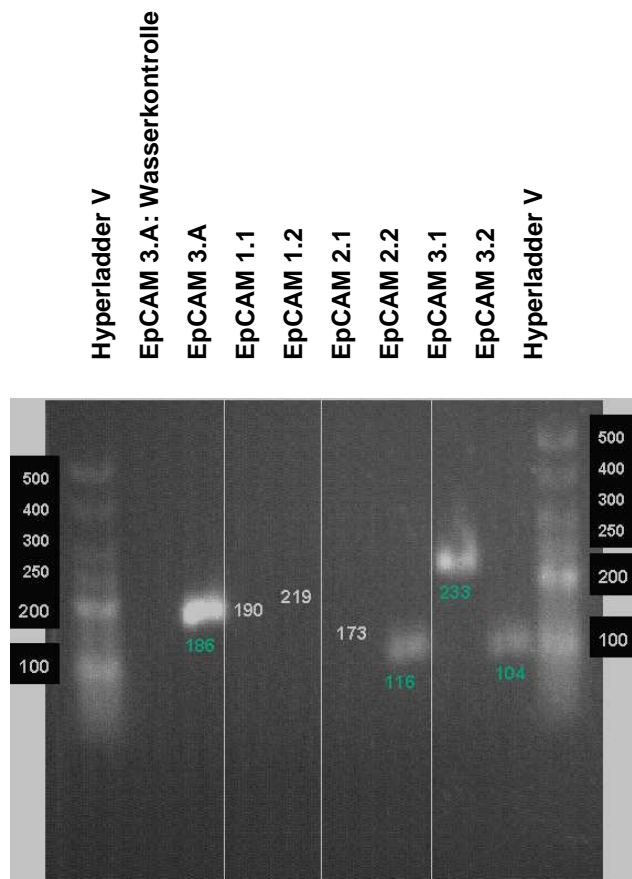
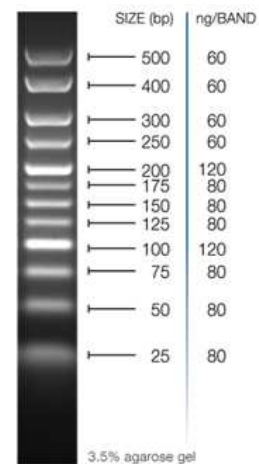


Abbildung 9: Früher Versuch der Primeretablierung für EpCAM
Die zu erwartenden Produktlängen (in bp) wurden in die Grafik eingefügt. Demnach gab es für folgende Primerpaare positive Ergebnisse: EpCAM 3.A, EpCAM 2.2, EpCAM 3.1 und EpCAM 3.2

HyperLadder V



- Higher intensity bands: **100bp and 200bp**
- Supplied in a ready-to-use format
- Each lane (5µl) provides 960ng of DNA

Abbildung 10: Arbeitsbereich der Hyperladder V, [www. Bioline.com](http://www.Bioline.com)

Bei der Suche nach den geeigneten Primerpaaren wurde auch untersucht, ob die geforderten Einstellungen des Thermocyclers hinsichtlich Annealingtemperatur und Anzahl der Zyklen gute Ergebnisse liefert, oder ob eventuell eine veränderte Einstellung erforderlich wäre (siehe hierzu Kapitel 2.8.3). Außerdem wurde ein Versuch mit RNA aus menschlicher Haut als Referenz unternommen. Die Ergebnisse hierzu sind Abbildung 11 zu entnehmen. Es zeigte sich, dass die durchgeführten Änderungen für die Produkte für EpCAM1.2 zu einer Verbesserung des Ergebnisses führten. Bei den anderen Primern waren die Ergebnisse ungefähr gleich. Mit diesen validierten Einstellungen (Annealingtemperatur für 45s bei 50°C) wurden die weiteren Versuche durchgeführt.

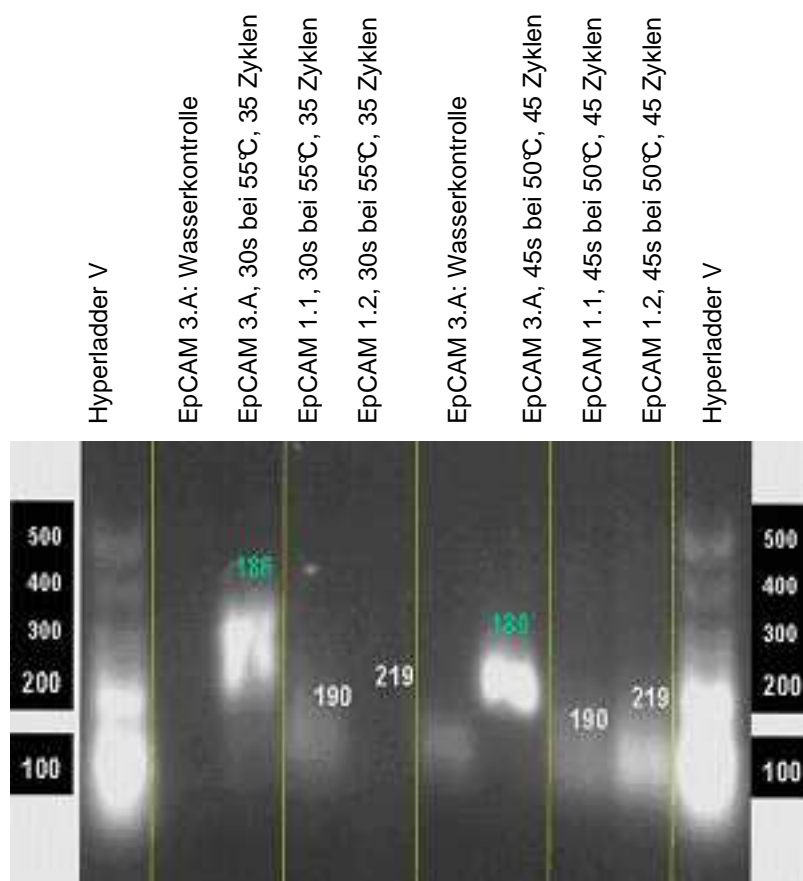


Abbildung 11: PCR mit Haut- RNA und veränderten Einstellungen

Der erste Teil der Proben durchlief die bisherigen Einstellungen, der zweite Teil die veränderten Einstellungen hinsichtlich Annealingtemperatur (45s bei 50°C, statt 30s bei 55°C) und Anzahl der Zyklen (45 statt 35).

Das Ergebnis der letzten herkömmlichen PCR zur Primerpaaretablierung ist Abbildung 12 zu entnehmen. Bei diesen Versuchen wurden auch unterschiedliche Primer kombiniert getestet.

Es wurden drei Primerpaare mit eindeutigen Ergebnissen gefunden (EpCAM 3.A, EpCAM 1.6 und EpCAM 2.2), denn bei diesen Proben wurden die erwarteten Produkte zuverlässig angezeigt. Das Ergebnis für EpCAM 3.2 ist nicht ganz so deutlich.

Mit diesen nun etablierten Primerpaaren wurden die weiteren Versuche durchgeführt.

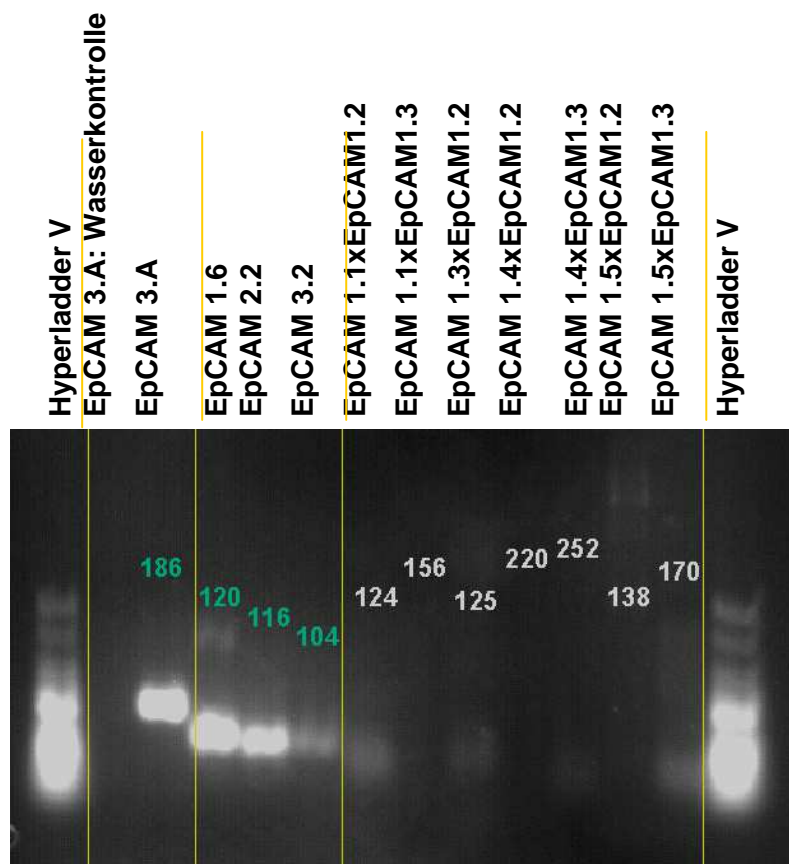


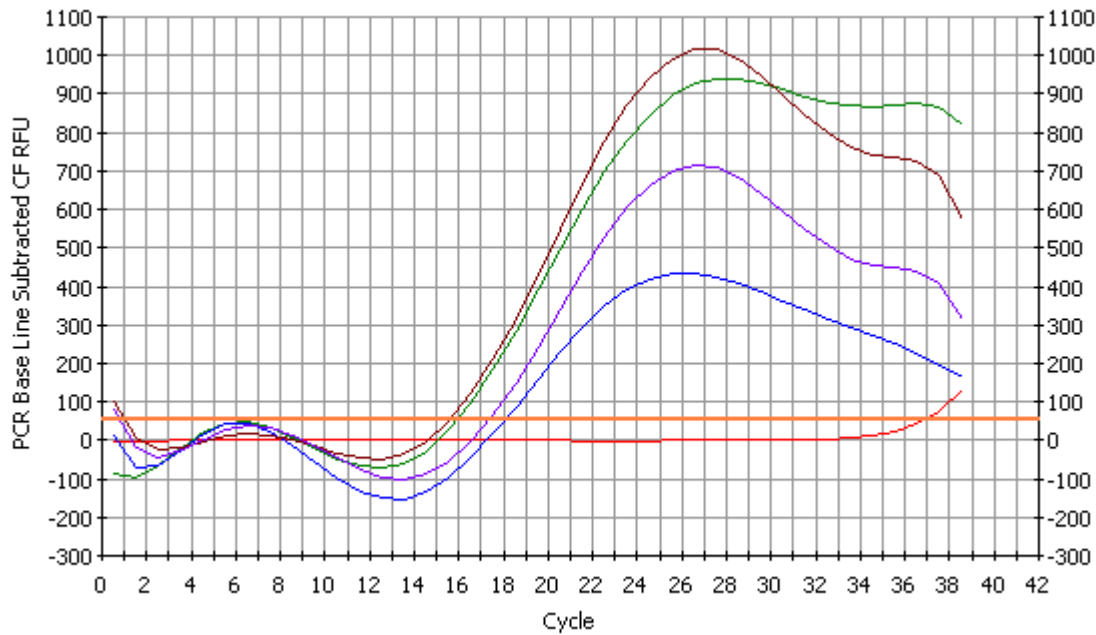
Abbildung 12: Letztes Gel zur Primer-etablierung mit herkömmlicher PCR. Die Abbildung zeigt auch neu kombinierte Primerpaare (weiße Zahlen für erwartete Produktlängen).

3.4. Etablierung der qRT-PCR

3.4.1. Die qRT-PCR mit den gefundenen Primerpaaren

Anschließend wurden mit den gefundenen Primersequenzen und Tumor-RNA Proben mit ausreichender, intakter RNA- Menge qRT-PCR Versuche unternommen.

Die Software zu dem iCcler, in dem die Reaktionen abliefen, stellte die Ergebnisse der Echtzeit- Detektion als Kurvendiagramm dar. Abbildung 13 zeigt ein solches Kurvendiagramm für einen Versuch mit den gefundenen Primerpaaren.



Well	Identifier	Ct
A01	water control	37
B01	EpCAM 3.A	16
C01	EpCAM 1.6	18.1
D01	EpCAM 2.2	15.7
E01	EpCAM 3.2	17.4

Abbildung 13: Etablierung der qRT-PCR

Die Abszisse stellt die Anzahl der PCR- Zyklen da, die Ordinate stellt den Anstieg der gemessenen Fluoreszenz dar. Diese korreliert mit dem Anstieg der Anzahl der Amplifikate. Es wird deutlich, dass die Amplifizierung über die gesamte Zeit messbar ist. Die rote waagerechte Linie stellt die eingestellte Linie für die Berechnung des Crossing Points (CP, hier aber „Ct“- Wert) dar. Dieser wird zur Quantifizierung der Startmenge herangezogen. Je eher dieser Punkt überschritten wird, desto größer war die Startmenge. Er entspricht der Anzahl der PCR- Zyklen, die nötig ist, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am CP befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA.

Normalerweise sollte der erreichte Wert des Fluoreszenzniveaus ein Plateau erreichen, welches in Abbildung 13 nicht der Fall ist. Dies deutet auf eventuelle Fehler, wie etwa nicht ganz geschlossene Reaktionsgefäße oder Ähnliches hin. Charakteristisch ist die lange lineare Zunahme der Amplifikate. EpCAM 3.A und EpCAM 2.2 liegen ungefähr in gleich großer Startmenge vor. Um zu überprüfen, dass wirklich nur cDNA vervielfältigt wurde, bot es sich an, eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen (Abbildung 14), wie in Kapitel 1.8. beschrieben.

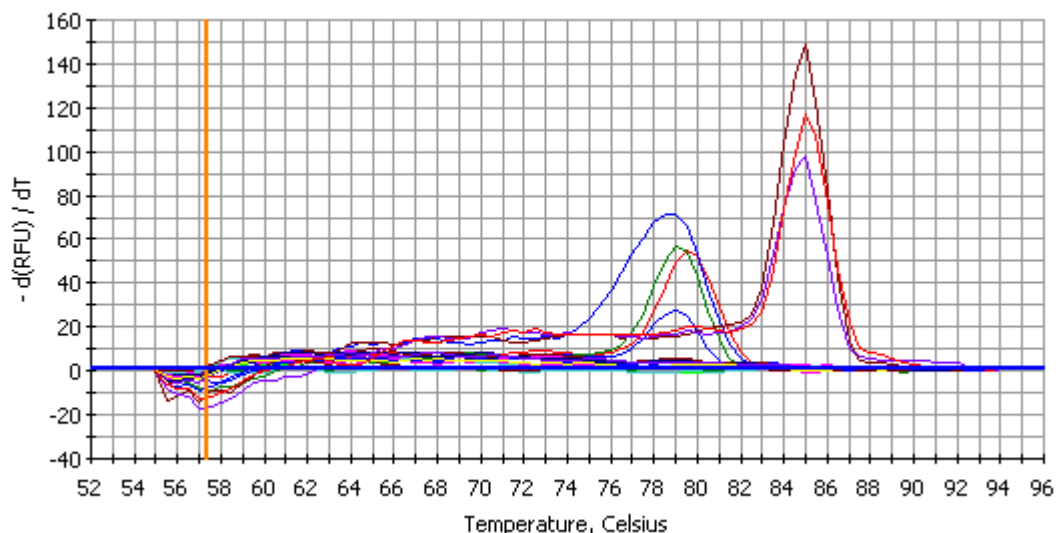


Abbildung 14: Schmelzkurvenanalyse

Die oben abgebildete Schmelzkurvenanalyse stammt aus einem anderen Versuch, als die in Abbildung 12 dargestellte Grafik. Diese Analyse ist ein Auszug aus einem frühen Versuch der Etablierung des Verfahrens. Hierbei ist zu sehen, dass die Maxima der Kurven nicht ähnlich sind. Das bedeutet, dass eine Kontamination vorlag, da ja nur eine Art von DNA vorlag und somit die Kurvenmaxima gleich sein sollten. Damit wird die hohe Sensitivität des Verfahrens demonstriert.

Aus Tabelle 5 wird deutlich, dass sich die CP- Werte in engen Bereichen bewegten. Das bedeutet, die getesteten Primerpaare lieferten zuverlässige Ergebnisse und die qRT-PCR wurde etabliert.

Tumorprobe Nr.	(vergl. Tab. 6)	EpCAM 3.A	EpCAM1.6	EpCAM 2.2	EpCAM 3.2
17/ Mai/ 05	9	15,3- 16,7	17,5- 19,1	14,9- 15,4	17,3- 23,8
9/ Mai/ 05	7	16,2- 17,0	18,4- 20,0	15,1- 16,2	18,1- 22,9
14/ Apr/ 05	4	15,9- 16,4	18,2- 19,4	15,2- 16,3	16,1- 21,7
2/ Jun/ 05	11	15,7	17,9	15,7	13,8
19/ Mai/ 05	10	15,4	17,7	15,6	16,0
27/ Jun/ 05	12	16,8	19,4	16,4	18,0

Tabelle 5: CP- Werte für mehrere RNA's

3.4.2. Validierung des Verfahrens mittels Degradierung der RNA

Wie in Kapitel 2.10.3. beschrieben, folgte nun eine Validierung des Verfahrens mittels Degradierung der RNA, um die Sensitivität des Verfahrens gegenüber Verunreinigungen zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

Bei diesen und den darauf folgenden Versuchen gilt: Je kleiner der Wert für den CP (also die Zyklenanzahl, bei der der CP erreicht wird) ist, desto mehr intakte RNA lag zu Beginn der qRT-PCR vor.

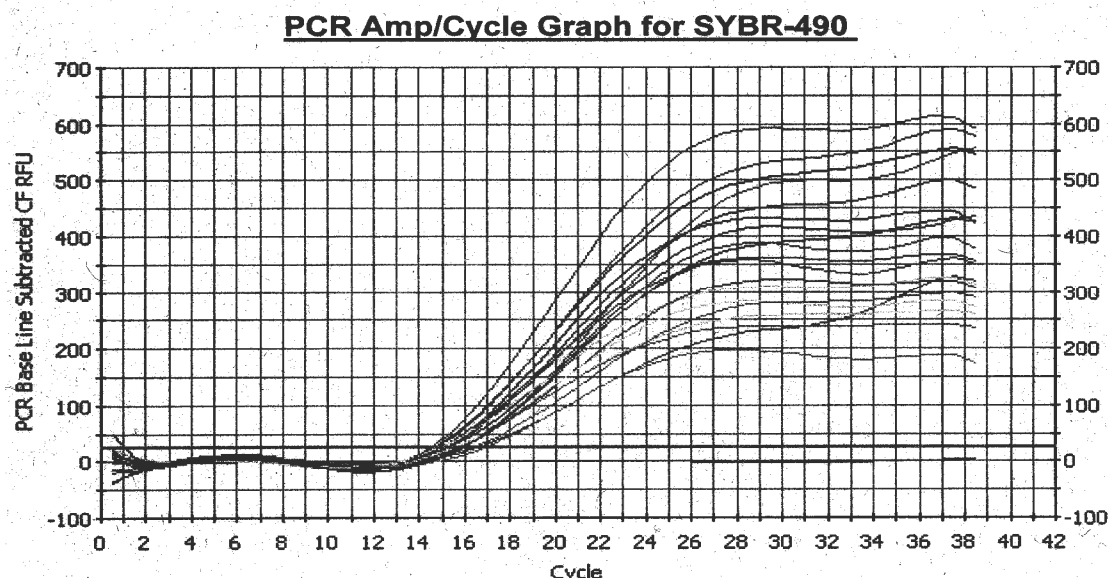


Abbildung 15: Validierung mittels Degradierung der RNA mit Speichel
In diesem Diagramm sind auch die Versuche mit der Verdünnungsreihe enthalten, sie wurden teilweise kombiniert durchgeführt.

Aus Abbildung 15 geht hervor, dass eine Behandlung der RNA mit Verunreinigungen mit zunehmendem Zerstörungspotential (hier: der Anstieg der Inkubationszeit) mit einer Verringerung der Menge des Startmaterials an RNA korrelierte. Allerdings wird deutlich, dass die Verunreinigungen erst nach einem längeren Zeitraum die Menge des Startmaterials herabsetzten. In Tabelle 6 und Abbildung 16 werden die CP's der einzelnen Reaktionen aufgelistet. Die obige Aussage wird aber nur durch die sichtbar werdende Tendenz untermauert. Sehr deutlich werden die Verringerungen des Startmaterials bei den „über Nacht“-Proben und bei EpCAM3, hier ist ein Anstieg der Werte, also eine Reduktion des Startmaterials ersichtlich. Noch deutlicher werden die Auswirkungen der Degradierung des Startmaterials aber bei der Degradierung mittels RNase. Dies ist in Tabelle 7 und Abbildung 17 zu sehen.

RNA:	Inkubationszeit [min]	EpCAM 1.6	EpCAM 2.2	EpCAM 3A
"frische" RNA	0	15,2	15,1	15,7
15 RNA	15	15,7	15,2	15,6
30 RNA	30	15,2	14,9	15,9
60 RNA	60	14,7	14,8	16,3
120 RNA	120	14,7	14,5	15,8
üN RNA	1200	15,5	15,6	16,8

Tabelle 6: Crossing Points für Degradierungsversuch mit Speichel

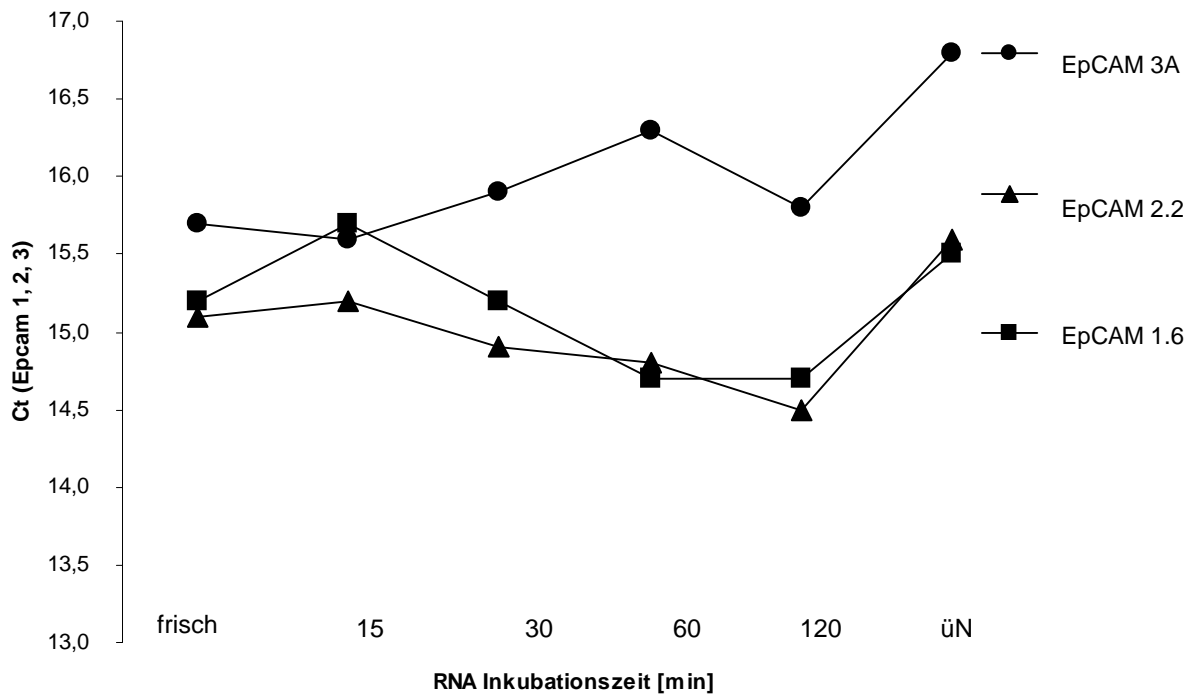


Abbildung 16: Diagramm der CP's für Degradierungsversuch mit Speichel

RNA:	Inkubationszeit [min]	EpCAM 1.6	EpCAM 2.2	EpCAM 3.A
"0" RNA	0			
5 RNA	5	27,1	25,6	24,1
10 RNA	10	27,2	25,4	24,3
15 RNA	15	28,4	25,3	25,0
30 RNA	30	28,8	28,4	26,2
60 RNA	60	30,5	30,6	28,5
120 RNA	120	31,2	30,8	29,0
ü N RNA	1200	33,0	34,5	30,7

Tabelle 7: Crossing Points für Degradierungsversuch mit RNase

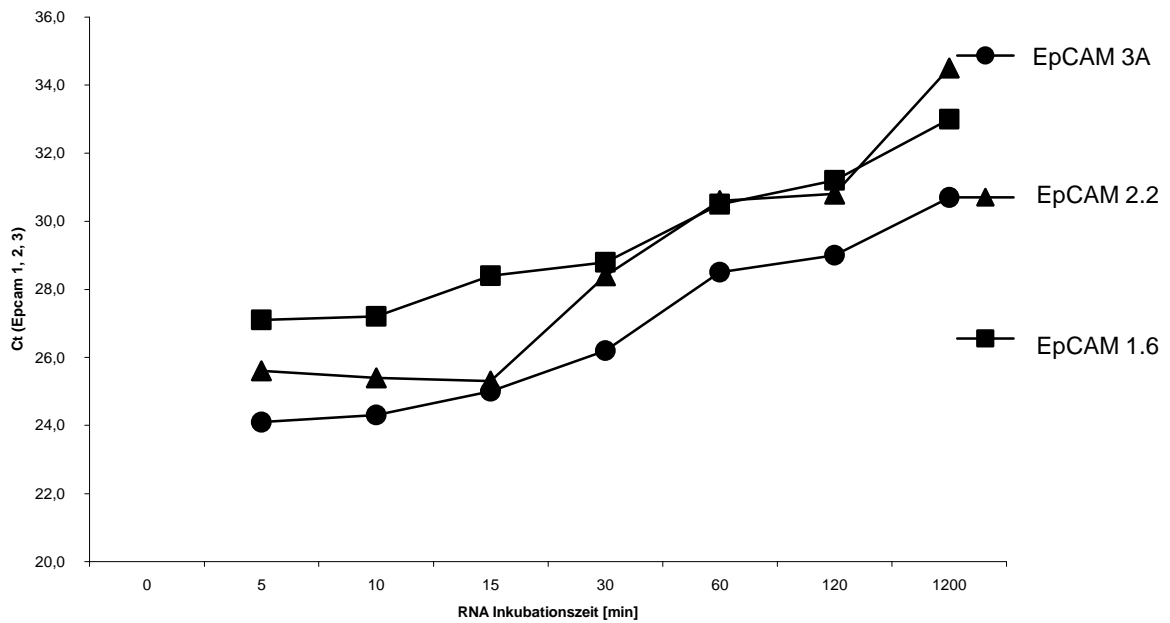


Abbildung 17: Diagramm der CP's für Degradierungsversuch mit RNase

3.4.3 Validierung des Verfahrens mittels RNA-Verdünnungsreihe

Als Nächstes wurde getestet, wie sensibel das Verfahren auf Schwankungen in der Konzentration der RNA reagiert. Dabei wurde deutlich, dass dies eine große Bedeutung hat. Wie aus Tabelle 8 und Abbildung 18 ersichtlich ist, sprach die qRT-PCR sensibel darauf an, da es eine kontinuierliche Zunahme der CP- Werte gab.

Verdünnung konz.	EpCAM 1.6	EpCAM 2.2	EpCAM 3.2	EpCAM 3.A
1:2	19,0	19,3	19,2	n/a
1:4	19,0	21,5	20,3	n/a
1:8	18,8	23,3	20,5	n/a
1:16	21,1	24,7	21,9	n/a
1:32	22,3	25,6	23,9	n/a
1:64	21,7	26,3	23,4	n/a

Tabelle 8: Crossing Points bei der Verdünnungsreihe

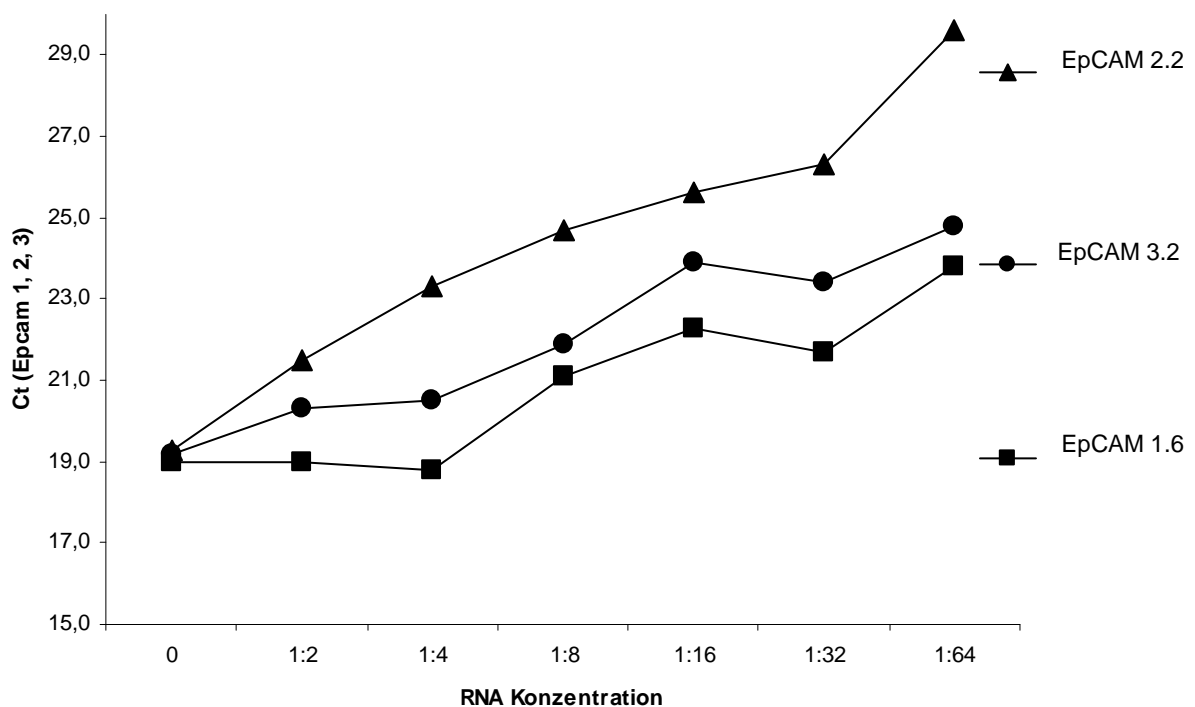


Abbildung 18: Diagramm der CP's für Verdünnungsreihe

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit sollte die Möglichkeit einer Qualitätskontrolle der Tumor RNA für Transfektionsversuche mit dendritischen Zellen durch quantitative Real-time PCR untersuchen. Es wurde ein Messverfahren entwickelt, welches eine quantitative Aussage zum Zustand der RNA ermöglicht. Dies war mittels quantitativer Real-Time PCR dreier Abschnitte eines geeigneten Markergens möglich.

Folgende Einzelziele wurden auf diesem Weg angestrebt:

1. Etablierung der Probenaufbereitung (RNA Gewinnung aus Tumoren)
2. Suche nach einem geeigneten Markergen mit herkömmlicher PCR
3. Etablierung der Real-Time PCR
4. Validierung des Verfahrens mittels RNA-Verdünnungsreihe und „künstlicher“ Degradierung der RNA

4.1. Diskussion der Materialien und Methoden

Das Verfahren der Homogenisierung mit dem Rotor-Stator-Homogenisierer stellt eine einfache und sichere Methode dar.

Van der Vorst et al. verglichen die manuelle Zerkleinerung von Gewebe mit der automatischen Homogenisierung (Van der Vorst et al. 2009). Sie untersuchen 10 Proben von Patienten nach Uvulektomien und 10 Biopsate von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf- Halsbereich. Nach dem Gefrieren der Proben wurden sie in gleich schwere Teile geteilt und dann manuell beziehungsweise automatisch homogenisiert. Sie kamen zu dem Schluss, dass die automatische Homogenisierung effizienter ist, was die totale RNA-Ausbeute und die Qualität und Quantität der mRNA betrifft (Van der Vorst et al. 2009).

Was die Methodik der RNA-Extraktion anbelangt, gibt es verschiedene Protokolle. Die Arbeitsgruppe um Xiang untersuchte drei verschiedene Verfahren, RNA zu isolieren. Es wurden die Guanin Thiocyanat Methode, die Trizol Methode und das RNeasy Protokoll untersucht (Xiang et al. 2001). Sie kam zu dem Ergebnis, dass alle drei Methoden benutzt werden können, um ein Housekeeping Gen zu extrahieren und dann mittels der qRT-PCR zu amplifizieren.

Deng et al. untersuchten sechs verschiedene Methoden der RNA Isolierung, darunter auch die RNeasy- Methode (Deng et al. 2005). Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass alle Methoden gute Ergebnisse liefern.

Die Idee, ein sogenanntes Housekeeping Gen zu untersuchen, wird von vielen Arbeitsgruppen favorisiert. Da es aber leider kein „perfektes“ Kontroll-Gen gibt, wird von einigen Gruppen vorgeschlagen, mehrere Gene gleichzeitig zu nutzen (Aerts et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen Aktin verwendet, da es sich als zuverlässig erwiesen hat. Die Expression von Aktin ist in der Tumorzelle im Vergleich zur gesunden Zelle nicht erhöht. Eine Grundvoraussetzung für ein Kontrollgen ist die Tatsache, daß es in allen Zellen in gleicher Kopienanzahl vorliegt und auch in allen Zellen exprimiert wird.

Die Auswahl der zu testenden Markergene fiel auf:

1. das 30-35kb lange pemphigus vulgaris Antigen Desmoglein 3
2. den Apoptose- Hemmer Survivin
3. das Tumor-assoziierte epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM

Diese Gene sind bekannt dafür, in Tumoren überexprimiert zu werden, beziehungsweise nur von Tumorzellen exprimiert zu werden und als Marker für Tumorzellen zu dienen (Ambrosini et al. 1997, Zeis et al. 2003, Stoecklein et al. 2006, Liu et al. 2007, Wang et al. 2007, Winter et al. 2003). Liu et al. untersuchten das Vorkommen von Desmoglein 3 in Karzinomen des Nasopharynx (Liu et al. 2007). Die Ergebnisse gaben Anlass zu der Annahme, dass dieses Gen auch ein guter Marker ist. Wang et al. beschäftigten sich ebenfalls mit dem Vorkommen von Desmoglein 3 und anderen Vertretern der Cadherin Familie in oralen Plattenepithelkarzinomen. Sie fanden heraus, dass die Zunahme der Expression dieser transmembranen Glykoproteine mit einem Fortschreiten der Malignität der oralen Karzinome zusammenhängt (Wang et al. 2007). Es ist nicht klar, ob Survivin in allen Neoplasien in erhöhter Konzentration zu finden ist, was die Funktion des Genes nahe liegen würde. Ambrosini et al. fanden heraus, dass dieses Gen allgemein in vielen Tumoren der Lunge, des Kolons, des Pankreas und der Brust verstärkt exprimiert wird. Zudem liegt es vermehrt in cirka 50% der high-grade non-Hodkin Lymphome vor (Ambrosini et al. 1997). Survivin spielt auch bei akuter myeloischer Leukämie eine Rolle (Zeis et al. 2003). Es wurde bestätigt, dass eine Transfektion dendritischer Zellen mit Survivin- RNA zu zytotoxischen Reaktionen auf eine große Breite von maligne veränderten hämatologischen Zelllinien führte. Außerdem stellte sich eine Langzeitimmunität ein. Untersuchungen einer Arbeitsgruppe um Stoecklein zeigten, dass das Gen EpCAM ein attraktives Ziel bei der Bekämpfung von ösophagealen Plattenepithelkarzinomen sein kann (Stoecklein

et al. 2006). Es wurde festgestellt, dass die Expression des Gens mit einer malignen Entartung der Zelle korreliert. Auch Winter et al. kamen zu dem Schluß, dass eine Neuexpression von EpCAM während der Karzinogenese von Plattenepithelzellen der Mundhöhle und der Lunge auftritt (Winter et al. 2003). Zudem wurde deutlich, dass die Zunahme der Expression des Gens mit der Progression von milder Dysplasie bis zum Karzinom im Einklang steht.

Das Verfahren der qRT-PCR bietet sich für eine hochwertige Qualitätskontrolle an, da es sehr sensitiv ist. Die Verwendung der drei Primerpaare ermöglicht eine Aussage über die Qualität des gesamten Gens. Zudem wird durch die Echtzeit Detektion die Fehleranfälligkeit einer normalen PCR minimiert, da die qRT-PCR eine verlässliche Quantifizierbarkeit liefert. Bei der normalen PCR ist man alleine auf eine Auftrennung der PCR Produkte mittels Elektrophorese angewiesen. Außerdem sind bei der herkömmlichen PCR ja nur die Produkte nach Ablauf der PCR messbar. Somit würden etwaige Fehler während der PCR nicht sichtbar werden. So versuchte die Arbeitsgruppe um Coindre im Vergleich eine Qualitätssicherung mittels RT-PCR und qRT-PCR (Coindre et al. 2002). Dabei beauftragte die Arbeitsgruppe auch ein unabhängiges Labor. Es wurden Tumorproben von Patienten mit malignen peripheren Nervscheiden-Tumoren untersucht. Dabei wies der Autor auf die große Sensitivität der PCR-Analytik hin. So ist es leicht möglich, eine falsch positive Aussage nach einer Kontamination zu bekommen. Die Arbeitsgruppe unterzog die Reaktionsprodukte der normalen PCR einer Gelelektrophorese und einer Ethidium-Bromid Färbung. Coindre et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die qRT-PCR die Risiken der Kontamination verringert. Aber auch bei diesen Versuchen wurden nur kurze Sequenzen des Genoms des Ausgangsmaterials untersucht, was keine Aussage zu der Unversehrtheit der Ausgangs RNA macht.

Angewendet wird die qRT-PCR heute bereits auf vielen anderen Gebieten. So haben einige Studien gezeigt, dass das Verfahren verlässliche Ergebnisse liefert (Hembruff et al. 2005). Die Arbeitsgruppe um Hembruff verwendete in ihren Versuchen ebenfalls das RNeasy Protokoll und nutzte den Farbstoff SYBR Green. Es wurde festgestellt, dass dieses Verfahren sich als das Beste in Bezug auf die Sensitivität und nicht zuletzt auf den Kosten-Nutzen Faktor erwies. Zudem fand man heraus, dass die Primer, die für die Reverse Transkriptase Reaktion vor einer herkömmlichen PCR verwendet werden (random hexamers und oligo dT), das Ergebnis der PCR beeinflussen, da sie die gesamte RNA in cDNA verwandeln, also

mRNA, tRNA und rRNA.

Die Methodik der qRT-PCR wird aktuell in einer Arbeit von Kroh et al. für die Analyse von microRNA- Biomarkern in Plasma und Serum genutzt. (Kroh et. al. 2010, Pan et al. 2010) MicroRNA's sind kleine RNA's die eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Aktivität der mRNA spielen. Aber auch in dieser Arbeit wurden durch die PCR nur kleine Fragmente amplifiziert.

Die Sensitivität der Quantifikation mittels interkalierendem Farbstoff hängt von der Spezifität der Primer ab (Morrison et al. 1998). Außerdem beeinflusst die Bildung von Primer-Dimer die Messung (Ponchel et al. 2003).

Vor diesem Hintergrund reihen sich die Methodik und die angewendeten Verfahren der vorliegenden Arbeit ein.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Homogenisierung der Gewebeproben führte in den meisten Fällen zu einem guten Aufschluss. Einige Tumorproben enthielten bisweilen relativ derbes Bindegewebe, was teilweise nur zu einer inkompletten Homogenisierung führte. Der nicht homogenisierte Geweberest wurde dann verworfen. Die Gewinnung der RNA war in den meisten Fällen problemlos mit dem RNeasy Kit möglich.

Es gab aber auch Proben, bei denen eine gute Konzentration an RNA nicht zu erreichen war. Deswegen wurde das RNeasy MiniElute Cleanup Kit exemplarisch angewendet. Dieses Kit ermöglicht eine Aufreinigung und Konzentrierung der gewonnenen RNA.

Es ist uns gelungen, speziell für Kopf- Hals- Tumore, das Gen EpCAM als Markergen zu etablieren. Dieses Gen erwies sich in den Versuchen als ein sehr zuverlässiger Marker. Des Weiteren wurden drei Primerpaare gefunden, die bei qRT-PCR-Versuchen verwendet werden konnten. Die Zuverlässigkeit der Primerpaare, wurde durch das Verändern verschiedener Parameter überprüft. Zum einen wurden verschiedene Tumorproben untersucht, zum anderen wurden die Einstellungen des Thermocyclers, in dem die herkömmliche PCR abläuft, verändert. Zusätzlich wurde auch ein Versuch mit RNA aus menschlicher Haut als Referenz unternommen.

Es konnte festgestellt werden, dass geringe Veränderungen zu leichten Verbesserungen führen. Daher wurden die Einstellungen für den Thermocycler leicht abgeändert. Somit war die Validierung des Verfahrens abgeschlossen. Die anfangs formulierten Thesen wurden verifiziert. Diese besagten, dass ein Markergen

gefunden werden sollte, das in seiner Komplettheit durch die PCR amplifiziert werden sollte und nicht nur kurze Fragmente. Daher wurden die Primerpaare entsprechend weit an den Enden der Gensequenz gewählt. Damit sollte die Methodik der RNA-Präparation überprüft werden. Je intakter das Gen war, desto schonender war die RNA-Präparation. Dies ist, wie beschrieben, ausschlaggebend für eine wirksame Transfektion in dendritische Zellen und damit für eine Vakzinierungstherapie.

Die qRT-PCR mit dem iCycler stellte sich als sehr geeignetes Werkzeug für die Detektierung von Verunreinigungen, besonders aber auch Verringerung der Menge an RNA heraus. Dies wurde durch die Validierung der Methodik durch Versuche mit künstlich degradiertes RNA sowie der Verdünnungsreihe dargestellt. Demnach kann gesagt werden, dass die quantitative RT-PCR sich sehr gut für eine hochwertige Qualitätskontrolle von RNA Präparationen aus Kopf- und Halstumoren eignet.

4.3. Schlussfolgerungen

Es wird mit den vorgestellten Methoden erstmals eine hochwertige Kontrolle bei diesem Verfahren möglich. Es konnte gezeigt werden, dass die Präparation von RNA aus Tumorzellen routinemäßig gut funktioniert. Es wurde ein geeignetes Markergen und geeignete Primersequenzen gefunden. Die sensitive qRT-PCR zeigt Verunreinigungen und Zerstörungen der RNA des Ausgangsmaterials zuverlässig an. Der letzte Schritt, um das Verfahren noch weiter zu validieren, wäre die Qualitätskontrolle mittels qRT-PCR in der hier entwickelten Form nach der Transfektion von RNA in dendritische Zellen. Dann lassen sich auch verschiedene Parameter wie unterschiedliche Transfektionsbedingungen testen. Die qRT-PCR würde eine eventuelle Qualitätsminderung der RNA durch die Transfektion detektieren und man könnte so ein Protokoll für optimale Bedingungen erstellen, beziehungsweise vorhandene Protokolle bestätigen. Ein weiterer Vorteil der qRT-PCR ist der routinemäßig mögliche Einsatz bei der Vakzinierungstherapie in vivo, die damit eine erhebliche Qualitätssicherung erlauben würde.

5. Zusammenfassung

Die Methodik der Vakzinierung mittels mit Antigen beladener dendritischer Zellen wird auf vielen Gebieten angewendet. So wird zum Beispiel versucht mittels dieser Technik eine T-Zell-Immunantwort gegen Tumor-Antigene einzuleiten. Daraus soll dann eine Unterdrückung von Metastasenbildung resultieren. Diese Strategien haben sich aber noch nicht als Standardmethode durchgesetzt und befinden sich noch in der klinischen Erprobung. Ein Nachteil des Verfahrens ist, dass bisher noch keine ausreichende und hochwertige Qualitätskontrolle bei der Gewinnung der Tumor-RNA möglich war. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung einer Möglichkeit zu dieser Kontrolle mittels der Durchführung einer quantitativen Real-Time Reverse Transkriptase-PCR. Dazu wurde zunächst eine Suche nach einem geeigneten Markergen mittels der herkömmlichen PCR mit vorgeschalteter, separater Reverse Transkriptase Reaktion durchgeführt. Es wurden das pemphigus vulgaris Antigen Desmoglein 3, der Apoptose- Hemmer Survivin und das Tumor-assoziierte epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM auf ihre Eignung als Markergen hin untersucht. Es stellte sich heraus, dass sich das Gen EpCAM am besten eignete, da es bei den RNA-Präparationen am zuverlässigsten in voller Länge vorlag. Dass es in voller Länge vorlag, wurde durch die Etablierung dreier Primerpaare für das Markergen getestet. Hierbei wurden Primerpaare für die PCR von Genanteilen aus dem Beginn der cDNA, also das Startcodon (5'-Produkt) enthaltend, dem Ende der cDNA, also das Stopcodon (3'-Produkt) enthaltend und eine Sequenz in der Mitte (Mid-Produkt) gesucht. Nachdem die Primerpaare gefunden worden waren, wurde die qRT-PCR etabliert. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit der Echtzeit-Detektion und liefert somit eine genaue Quantifizierung der PCR- Produkte, wodurch ein Rückschluß auf die Unversehrtheit der RNA-Präparation möglich wird. Um dieses Vorgehen zu validieren, wurden Versuche mit einer degradierten RNA und einer Verdünnungsreihe der RNA unternommen. Diese Methodik erwies sich als sensibles Werkzeug bei der Qualitätskontrolle der RNA, so dass gesagt werden kann, dass die qRT- PCR in diesem Bereich eingesetzt werden kann. Bis sie aber den gewünschten Zweck erfüllt, muß noch die Validierung an transfizierten dendritischen Zellen etabliert werden, da der Nachweis der intakten transfizierten RNA aus elektroporierten DC im Rahmen dieser Experimente nicht gelang.

Es ist in Zukunft notwendig zu untersuchen, ob dieses Verfahren auch bei anderen Tumorarten eingesetzt werden kann. Dort werden vermutlich andere Markergene

gesucht werden müssen. Außerdem sind größer angelegte Studien mit mehr Gewebeproben notwendig, um den Studienergebnissen eine statistisch besser abgesicherte Aussagekraft zu verschaffen.

6. Anhang: Patientenfragebogen

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel

Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

PD Dr. Dr. Ingo Springer

Institut für Immunologie

Dr. rer. nat. Axel Heiser

Spenderinformation zur Freigabe von Gewebe

durch Tumorpatientinnen und –patienten im Rahmen der Studie

„Entwicklung neuer Strategien zur Tumorstabilisierung unter Verwendung dendritischer Zellen“

Sehr geehrte Patientinnen und Patienten,

wir bitten Sie im Rahmen dieser Studie Tumorgewebe, das im Rahmen der normalen Behandlung (Biopsien oder operative Therapieverfahren) entnommen wird und das nicht für die Untersuchungen im Rahmen der Therapie benötigt wird, für wissenschaftliche Untersuchungen freizugeben. Wir werden aus dem Gewebe Zellen züchten, die im Rahmen von Laboruntersuchungen zur Weiterentwicklung einer neuen Immuntherapie von Krebs eingesetzt werden sollen. Die Behandlung Ihrer Erkrankung ist im Rahmen dieser Studie nicht vorgesehen. Es geht vielmehr um Laborexperimente, die mit aus Ihren Gewebeproben gewonnenen Zellen durchgeführt werden. Wir versuchen Wissen zu erlangen, das bei der Entwicklung neuer Behandlungsformen und damit in der Zukunft anderen helfen kann.

Ziel der Studie

Tumorzellen werden vom Immunsystem der Erkrankten nicht vernichtet. Ein besonderer Typ von Zellen, die dendritischen Zellen, können aus Blut gewonnen werden und dann außerhalb des Körpers mit Antigenen von Tumorzellen beladen werden. Diese dendritischen Zellen verarbeiten die Tumorantigene und können anschließend als `Tumorstabilisierung` in Krebskranke zurückgegeben werden, um dann andere Zellen des Immunsystems anzuregen gegen den Tumor zu wirken. In dieser Studie wollen wir neue Methoden zur Gewinnung dendritischer Zellen und der Beladung mit Tumorantigenen im Labor erproben und damit wirksamere Tumorstabilisierung entwickeln. Die dafür benötigten Tumorantigene können aus den von Ihnen freigegebenen Gewebeproben gewonnen werden.

Risiken und Nebenwirkungen

Über Risiken, Nebenwirkungen und Kontraindikationen der operativen Entnahme von Tumorgewebe wurden Sie im Rahmen der operativen Maßnahme durch die ausführende Klinik aufgeklärt. Die schriftliche Einwilligung zu der operativen Maßnahme ist Voraussetzung für die Teilnahme an dieser Studie.

Datenschutz

Die Gewebeproben von freiwilligen Spendern werden durch ein vertrauliches Code-System identifiziert, das nur den beteiligten Ärzten und Wissenschaftlern bekannt ist. Die Schweigepflicht und der vertrauliche Umgang mit allen Daten wird beachtet. Eine Weitergabe der Information erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form und unter Beachtung der Auflagen des Datenschutzgesetzes.

Widerruf der Einwilligung

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Es besteht jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für den Spender, die Möglichkeit das Einverständnis zur Studienteilnahme zu widerrufen.

Einverständniserklärung

im Rahmen der Studie:

"Entwicklung neuer Strategien zur Tumorstabilisierung unter Verwendung dendritischer Zellen"

Vor- und Nachname der Patientin/des Patienten

Geburtsdatum

Ich bin ausreichend in mündlicher und schriftlicher Form über die Ziele und Methoden, die möglichen Risiken und den Nutzen der Studie informiert worden. Ich habe die Spenderinformation gelesen und den Inhalt verstanden. Ich hatte ausreichend Gelegenheit, die Studie mit meinem Arzt zu besprechen und Fragen zu stellen. Alle meine Fragen und Bedenken wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich weiß, dass meine Studienteilnahme freiwillig ist und dass ich jederzeit ohne Angabe von Gründen meine Zusage zur Teilnahme zurückziehen kann und mir daraus für meine weitere Behandlung keine Nachteile entstehen.

Ich bin darüber informiert worden, dass im Rahmen der Studie meine Daten und Krankheitsdaten einschließlich der Daten über Geschlecht, Alter, Gewicht und Körpergröße aufgezeichnet und anonymisiert (d.h. ohne Namensnennung) zur Auswertung der Ergebnisse verwendet werden. Alle im Rahmen der Studie erhobenen Daten werden strikt vertraulich gemäß dem Datenschutz behandelt. Einer wissenschaftlichen Auswertung der anonymisierten Daten und einer möglichen Veröffentlichung der Ergebnisse stimme ich zu.

Die Einwilligungserklärung zur Operation habe ich unterschrieben und abgegeben.

Ich willige hiermit ein, dass mein Gewebe, das im Rahmen der Operation entnommen wird und nicht für Untersuchungen im Rahmen der Therapie benötigt wird, für die oben genannte wissenschaftliche Studie genutzt werden kann.

Eine Kopie dieser Einwilligung und eine Kopie der Patienteninformationsschrift habe ich erhalten.

Unterschrift der Spenderin/des Spenders

Datum

Unterschrift der Ärztin/des Arztes

Datum

7. Literaturverzeichnis

Aerts, J.L., Gonzales, M.I., Topalian, S.L. (2004): Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time rt.pcr. *Biotechniques*, 36, 84-6, 88, 90-91

Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C. (1997): A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.*, 3, 917-921

Banchereau, J., Steinman, R.,M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-52

Barrett, J.C.(1993): Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assesment. *Environ Health Perspect*, 100, 9

Coindre, J.M., Hostein, I., Benhattar, J., Lussan, C., Rivel, J., Guillou, L. (2002): Malignant peripheral nerve sheath tumors are t(x;18)-negative sarcomas. molecular analysis of 25 cases occurring in neurofibromatosis type 1 patients, using two different rt-pcr-based methods of detection. *Mod Pathol.*, 5, 589-592

Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F., Bernema, Z.N. (2007): Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol.*, 6, 1365-1374

Deng, M.Y., Wang, H., Ward, G.B., Beckham, T.R., McKenna, T.S. (2005): Comparison of six rna extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-pcr. *J Vet Diagn Invest.*, 17, 574-578

Dunn, G., Oliver, K.M., Loke, D., Stafford, N.D., Greenman, J. (2005): Dendritic cells and hnscc: a potential treatment option? *Oncol Rep.*, 13, 3-10

Eckardt, A., (1993): Clinical impact of synchronous and metachronous malignancies in patients with oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, 22, 282-284

Ganly, I., Soutar, D., Kaye, S. (2000): Current role of gene therapy in head and neck cancer. *Eur J Surg Oncol*, 26, 338-343

Gritz, E.R., Carr, C.R., Rapkin, D.A., Chang, C., Beumer, J., Ward, P.H. (1991): A smoking cessation intervention for head and neck cancer patients: trial design, patient accrual, and characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 1, 67-73

Heiser, A., Maurice, M.A., Yancey, D.R., Coleman, D.M., Dahm, P., Vieweg, J. (2001): Human dendritic cells transfected with renal tumor rna stimulate polyclonal t-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res.*, 61, 3388-3393

Heiser, A., Coleman, D., Dannull, J., Yancey, D., Maurice, M.A., Lallas, C.D., Dahm, P., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., Vieweg, J. (2002): Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen rna stimulate ctl responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest.*, 109, 409-417

- Hembruff, S.L., Villeneuve, D.J., Parissenti, A.M. (2005) : The optimization of quantitative reverse transcription pcr for verification of cdna microarray data. *Anal Biochem.*, 345, 237-249
- Howaldt, H.P., Kainz, M., Euler, B., Vorast, H. (1999): Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. *DÖSAK. J Craniomaxillofac Surg.*, 27, 275-288
- Jarnjak-Jankovic, S., Hammerstad, H., Saebøe-Larsen, S., Kvalheim, G., Gaudernack, G. (2007): A full scale comparative study of methods for generation of functional dendritic cells for use as cancer vaccines. *BMC Cancer*, 7, 119
- Karcher, J., Dyckhoff, G., Beckhove, P., Reisser, C., Brysch, M., Ziouta, Y., Helmke, B.H., Weidauer, H., Schirrmacher, V., Herold-Mende, C. (2004): Antitumor vaccination in patients with head and neck squamous cell carcinomas with autologous virus- modified tumor cells. *Cancer Res.*, 64, 8057-8061
- Kroh, E.M., Parkin, R.K., Mitchell, P.S., Tewari, M. (2010): Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50, 298-301
- Kyte, J.A., Kvalheim, G., Lislud, K., thor Straten, P., Dueland, S., Aamdal, S., Gaudernack, G. (2006): T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mrna transfected dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.*, 56, 659-675
- Liu, Z.Q., Tian, Y.Q., Ma, F.R., Zhu, L., Hu, Y.F. (2007): Expression of desmoglein 3 in nasopharyngeal carcinoma: research of 22 cases. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.*, 87, 2541-2543
- Mohr, C. (1997): Bericht über die 27. Jahrestagung des Deutsch- Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK). *Mund Kiefer Gesichtschirurgie*, 1, 125
- Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T. (1998): Quantification of low-copy transcripts by continuous sybr green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24, 954-958, 960, 962
- Morgenroth, K., Bremerich, A., Lange, D.E. (1996): *Geschwülste der Mundhöhle. Pathologie der Mundhöhle*, Stuttgart-New York, 208-254
- Nelson, E.L., Li, X., Hsu, F.J., Kwak, L.W., Levy, R., Clayberger, C., Krensky, A.M. (1996): Tumor-specific, cytotoxic t-lymphocyte response after idiotype vaccination for b-cell, non-hodgkin's lymphoma. *Blood*, 88, 580-589
- Nair, S.K., Morse, M., Boczkowski, D., Cumming, R.I., Vasovic, L., Gilboa, E., Lyerly, H.K. (2002): Induction of tumor-specific cytotoxic t lymphocytes in cancer patients by autologous tumor rna-transfected dendritic cells. *Ann Surg.*, 235, 540-549
- Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., Schadendorf, D. (1998): Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.*, 4, 328-332

- Onoda, N., Nehmi, A., Weiner, D., Mujumdar, S., Christen, R., Los, G. (2001): Nicotine affects the signaling of the death pathway, reducing the response of head and neck cancer cell lines to DNA damaging agents. *Head Neck*, 23, 860-870
- Pan, X., Murashov, A.K., Stellwag, E.J., Zhang, B. (2010): Monitoring microrna expression during embryonic stem-cell differentiation using quantitative real-time pcr (qrt-pcr). *Methods Mol Biol.*, 650, 213-224
- Pignon, J.P., Bourhis, J., Domenge, C., Designe, L. (2000): Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet*, 355, 949-955
- Platz, H., Fries, R., Hudec, M. (1988): Introduction to the "prospective dosak study on squamous cell carcinoma of the lips, the oral cavity and the oropharynx". *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir.*, 12, 293-302
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S.M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs, J.D., Markham, A.F. (2003): Real-time pcr based on sybr-green I fluorescence: an alternative to the taqman assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.*, 3, 18
- Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N. (2003): Cancer immunotherapy using rna-loaded dendritic cells. *Clin Exp Immunol.*, 134, 378-384
- Reichart, P. A., Hausamen, J.-E., Becker, J., Neukam, F.W., Schliephake, H., Schmelzeisen, R. (2003): *Curriculum Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie, Band III. Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin*, 447, 450-451, 453-454, 466
- Schuler, G., Romani, N., Stingl, G., Wolff, K. (1983): Coated langerhans cell granules in histiocytosis x cells. *Ultrastruct Pathol.*, 5, 77-82
- Scott-Taylor, T.H., Pettengell, R., Clarke, I., Stuhler, G., La Barthe, M.C., Walden, P., Dalgleish, A.G. (200): Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines. *Biochim Biophys Acta*, 1500, 265-279
- Shibagaki, N., Udey, M.C. (2002): Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity. *J Immunol.*, 168, 2393-2401
- Steinman, R.M., Adams., J.C., Cohn, Z.A. (1975): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med.*, 141, 804-820
- Steinman, R.M., Witmer, M.D., (1978): Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 75, 51320-51326

- Stoecklein, N.H., Siegmund, A., Scheunemann, P., Luebke, A.M., Erbersdobler, A., Verde, P.E., Eisenberger, C.F., Peiper, M., Rehders, A., Esch, J.S., Knoefel, W.T., Hosch, S.B. (2006): Ep-cam expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer*, 6,165
- Thews, G., Vaupel, P. (2001): *Vegetative Physiologie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 50-70
- Ueno, H., Tcherepanova, I., Reygrobellet, O., Laughner, E., Ventura, C., Palucka, A.K., Banchereau, J. (2004): Dendritic cell subsets generated from cd34+ hematopoietic progenitors can be transfected with mrna and induce antigen- specific cytotoxic t cell responses. *J Immunol Methods*, 285, 171-180
- Van der Vorst, S., Dekairelle, A.F., Irengé, L., Hamoir, M., Robert, A., Gala, J.L. (2009): Automated cell disruption is a reliable and effective method of isolating RNA from fresh snap-frozen normal and malignant oral mucosa samples. *Clin Chem Lab Med.*, 47, 294-301
- Van Driessche, A., Ponsaerts, P., Van Bockstaele, D.R., Van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N.(2005): Messenger RNA electroporation: an efficient tool in immunotherapy and stem cell research. *Folia Histochem Cytobiol.*, 43,213-216
- Van Tendeloo, V.F., Ponsaerts, P., Lardon, F., Nijs, G., Lenjou, M., Van Broeckhoven, C., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. (2001): Highly efficient gene delivery by mrna electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mrna and to electroporation of plasmid cdna for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood*, 98, 49-56
- Wang, L., Liu, T., Wang, Y., Cao, L., Nishioka, M., Aguirre, R.L., Ishikawa, A., Geng, L., Okada, N. (2007): Altered expression of desmocollin 3, desmoglein 3, and beta-catenin in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and cell proliferation. *Virchows Arch.*, 451, 959-966
- Whiteside, T.L. (2007): Anti-tumor vaccines in head and neck cancer: targeting immune responses to the tumor. *Curr Cancer Drug Targets.*, 7, 633-642
- Winter, M.J., Nagtegaal, I.D., van Krieken, J.H., Litvinov, S.V. (2003): The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol.*, 163, 2139–2148
- Xiang, X., Qiu, D., Hegele, R.D., Tan, W.C. (2001): Comparison of different methods of total rna extraction for viral detection in sputum. *J Virol Methods*, 94, 129-135
- Xu, J.J., Yao, K., Yu, C.J., Chen, X., Lu, M.P., Sun, H., Li, B.Z., Ding, C.N., Zhou. F. (2006): Anti-tumor immunity against nasopharyngeal carcinoma by means of Impa2a-specific cytotoxic t lymphocytes induced by dendritic cells. *Auris Nasus Larynx.*, 33, 441-446

Zeis, M., Siegel, S., Wagner, A., Schmitz, M., Marget, M., Kühl-Burmeister, R., Adamzik, I., Kabelitz, D., Dreger, P., Schmitz, N., Heiser, A. (2003): Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-rna-transfected dendritic cells. *J Immunol.*, 170, 5391-5397

8. Danksagung

Danken möchte ich an dieser Stelle herzlich Herrn Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz, Direktor des Institutes für Immunologie, Universität Kiel für die Überlassung der benötigten Räumlichkeiten und Materialien.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang, Direktor der Klinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie, Kiel danke ich für die Genehmigung der Nutzung der Gewebeproben für die Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Axel Heiser und Herrn Prof. Dr. Dr. Ingo Springer für die freundliche Überlassung des Themas, die wertvolle Beratung und Hilfe bei der Laborarbeit, sowie für die Gewinnung der Gewebeproben während der operativen Eingriffe.

Ein sehr herzliches Dankeschön geht an Frau Prof. Dr. Sabine Adam für die gründliche Durchsicht der Arbeit und für die sehr nette Betreuung während der Phase des Verfassens der Dissertation.

Bei Frau PD Dr. Katharina Peters bedanke ich mich herzlich für die histologischen Untersuchungen der Präparate zur Klärung des Gehalts an Tumorzellen.

Mein Dank gilt auch den Patienten, die sich bereit erklärt haben, an dieser Studie teilzunehmen.

Von Herzen danke ich meiner Familie und Frau Dr. Sylvana Däbel.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stephan Porsch
Geburtsdatum: 15.02.1980
Geburtsort: Baden- Baden, Baden- Württemberg
Familienstand: ledig
Eltern: Jürgen Porsch, Lehrer, im Ruhestand
Gudrun Porsch, Lehrerin, im Ruhestand
Geschwister: Christina Porsch, Rechtsanwalts- und Notargehilfin

Schulbildung

1987-1992 Grundschule Fahrdorf
1992-1995 Dannewerkschule Schleswig, Realschule
1995- 2000 Domschule Schleswig, Gymnasium, Abschluß Abitur

Wehrdienst

2000- 2001 in Roth und Kropp

Hochschulbildung

2001- 2002 Studium der Zahnmedizin an der Albert- Ludwigs-
Universität in Freiburg i.Brsq.
2002- 2008 Studium der Zahnmedizin an der Christian- Albrechts-
Universität in Kiel
Juni 2008 Staatsexamen, Verleihung der Approbation