

Aus der Einrichtung für Knochenmarktransplantation  
des universitären Transplantationszentrums  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Leiter: Prof. Dr. med.h.c. A.R. Zander

**Evaluation der Mammaglobin-Reversen-Transkriptase-  
Polymerasenkettenreaktion für die Detektion  
von residuellen Tumorzellen  
bei Mammakarzinompatientinnen**

Dissertation zur  
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
vorgelegt beim Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg  
von Birte Detlefsen

Hamburg, im Juli 2006

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1. <u>HYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>2. <u>EINLEITUNG</u></b>	<b>2-11</b>
<b>2.1. Minimal Residual Disease</b>	<b>2</b>
<i>2.1.1. Nachweisverfahren für die Minimal Residual Disease</i>	<i>2-4</i>
<b>2.2. Mammakarzinome</b>	<b>4</b>
<i>2.2.1. Epidemiologie</i>	<i>4</i>
<i>2.2.2. Klassifikation</i>	<i>4-5</i>
<i>2.2.3. Prognostische Faktoren</i>	<i>5-6</i>
<i>2.2.4. MRD beim Mammakarzinom</i>	<i>6</i>
<i>2.2.5. Therapieoptionen</i>	<i>6</i>
<b>2.3. Hochdosischemotherapie</b>	<b>6-7</b>
<b>2.4. Knochenmarkstransplantation</b>	<b>7</b>
<i>2.4.1. Autologe Knochenmarkstransplantation</i>	<i>7-8</i>
<b>2.5. Polymerasenkettenreaktion</b>	<b>8</b>
<i>2.6. Diskussion der aktuellen Studien zur Mammaglobin-RT-PCR</i>	<i>8-11</i>
<b>3. <u>MATERIALIEN UND METHODEN</u></b>	<b>12-34</b>
<b>3.1. Materialien</b>	<b>12</b>
<i>3.1.1. Reagenzien und Chemikalien</i>	<i>12</i>
<i>3.1.2. Labormaterialien</i>	<i>12</i>
<i>3.1.3. Geräte</i>	<i>13</i>
<b>3.2. Tumorzellreihen</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Chemotherapieregime bei Mammakarzinom</b>	<b>17</b>

<b>3.4. Kultivierung eukaryontischer Zellen</b>	<b>18</b>
3.4.1. Nährmedium	18
3.4.2. Aussaat der Zelllinien	19
3.4.3. Abernten der Zelllinien	19
3.4.4. Zellzählung	20
3.4.5. Einfrieren lebender Zellen	20
<b>3.5. Gewinnung humaner Leukozyten</b>	<b>20</b>
<b>3.6. Verdünnungsreihen</b>	<b>21</b>
<b>3.7. Präparation von RNA</b>	<b>22</b>
3.7.1. RNA-Extraktion	22
3.7.2. Konzentrationsbestimmung	23
<b>3.8. Die Reverse Transkription und die Polymerasenkettenreaktion</b>	<b>23</b>
3.8.1. Abbildung zum Reaktionsablauf	25
3.8.2. Ansatz der Primer	25
3.8.3. Primer (Mammaglobin, GAPDH)	26
3.8.4. Reverse Transkription	27
3.8.5. Polymerasenkettenreaktion	27
<b>3.9. Agarose-Gelelektrophorese</b>	<b>30</b>
<b>3.10. Wachstumsfaktoren</b>	<b>31</b>
3.10.1. Stimulationsversuche	31
3.10.2. Vorkommen und Funktion der Wachstumsfaktoren	32
3.10.3. Ansatz der Wachstumsfaktoren	33
3.10.4. Interaktionen der Wachstumsfaktoren	33
<b>3.11. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse</b>	<b>34</b>

<b>4. <u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>35-46</b>
<b>4.1. Optimierung der PCR-Bedingungen</b>	<b>35</b>
<b>4.2. Verdünnungsreihen von MDA/MB und MCF-7</b>	<b>38</b>
<b>4.3. MG-RT-PCR angewandt auf die Mammakarzinomproben</b>	<b>39</b>
<b>4.4. Negativkontrollen</b>	<b>41</b>
<b>4.5. MG-RT-PCR angewandt auf die Tumorzellreihen</b>	<b>42</b>
<b>4.6. Stimulationsversuche mit den Zellreihen (Raji)</b>	<b>43</b>
<b>4.7. Stimulationsversuche mit Patientenproben (AML) und Tabelle zur Auswertung der Stimulation durch Zytokine von den Zellreihen und den Patientenproben, Durchführung T-Test</b>	<b>44</b>
<b>4.8. Vergleich der Immunzytochemie und der RT-PCR als Nachweismethode</b>	<b>46</b>
<b>5. <u>DISKUSSION</u></b>	<b>47-53</b>
<b>5.1. Diskussion der PCR- Materialien und Methoden</b>	<b>47</b>
<i>5.1.1. Nested-PCR</i>	<i>47</i>
<i>5.1.2. Primer</i>	<i>47</i>
<i>5.1.3. Temperaturzyklen</i>	<i>48</i>
<i>5.1.4. Zelllinien</i>	<i>49</i>
<i>5.1.5. Zytokine</i>	<i>49</i>
<b>5.2 Diskussion der im Kapitel 4 aufgeführten Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>5.3 Vergleich der dargestellten Ergebnisse mit aktueller Puplicatation</b>	<b>51</b>
<b>6. <u>SCHLUSSFOLGERUNG</u></b>	<b>54, 55</b>
<b>7. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>56-59</b>
<b>8. <u>DANKSAGUNG</u></b>	<b>60</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKMT	Autologe Knochenmarktransplantation
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Department of Human and Animal Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
Flt-3	Flt-3 Ligand, Zytokin
h	Stunde
HDCT	Hochdosischemotherapie
H <sub>2</sub> O	Wasser
HLA	Human leukocyte antigen
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
IFN $\gamma$	Interferon Gamma
IL-3	Interleukin 3
KM	Knochenmark
l	Liter
LP	Leukapherese
M	Mol
MG	Mammaglobin
min	Minute
ml	Milliliter
MRD	Minimal Residual Disease
$\mu$ l	Mikroliter
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OD	Optische Dichte
p	pico
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasenkettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Reverse Transkription
SCF	Stammzellefaktor
sec	Sekunde
Taq	Thermus aquaticus
TPO	Thrombopoetin
U	Unit

## **1. Hypothese und Fragestellung**

Bei der Therapie des Mammakarzinoms durch Hochdosischemotherapie mit konsekutiver, autologer Stammzelltransplantation kann es zur Reinfusion von okkulten Tumorzellen durch das Autotransplantat kommen. Aufgrund dieser Erkenntnis wird der Entwicklung eines hochsensitiven Nachweisverfahrens für die Beurteilung der Prognose und der weiteren Therapie eine entscheidende Bedeutung beigemessen.

Ziel der Dissertationsarbeit war die Entwicklung einer Mammaglobin- Reverse- Transkriptase- Polymerasen- Kettenreaktion zum Nachweis der sogenannte Minimal Residual Disease bei Patientinnen mit Mammakarzinom. Auf der Basis der von Zach et al. publizierten Ergebnisse sollte die Etablierung und Evaluation der MG-RT- PCR erfolgen. Die zweite Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss unterschiedlicher Zytokine z.B. als Entzündungsmediatoren auf die Spezifität der Methode zu untersuchen.

Die Entwicklung des Nachweisverfahrens sollte zunächst mit den Tumorzelllinien MCF-7 und MDA/MB 453 von Mammakarzinomen etabliert werden. Zur Bestimmung der Sensitivität der Methode, sollte diese durch Verdünnungsreihen mit Buffy Coat und den Zelllinien MCF-7 und MDA-MD 453 kalibriert werden. Anschließend war die Anwendung der standardisierten PCR- Bedingungen auf Patientenproben und Zellkulturen geplant. Um die Spezifität der Methode hinsichtlich des Nachweises von Mammaglobin zu überprüfen, sollte die Methode zusätzlich auf ein Kontrollkollektiv angewandt werden. Die Ergebnisse der mittels der MG-RT-PCR untersuchten Proben sollten im Anschluss mit den Resultaten der parallel durchgeführten CK-20-RT-PCR und Immunzytochemie verglichen werden, um Rückschlüsse auf die Spezifität der Methode zu ziehen. Vor dem Hintergrund der bereits erhobenen Daten für die CK-20-RT-PCR und CK-19-RT-PCR sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit bestimmte Störfaktoren zu einer hohen Anzahl falsch-positiver Befunde führen könnten. Hierfür sollten unterschiedliche Wachstumsfaktoren mit definierter Funktion eingesetzt werden.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Minimale Resterkrankung ( Minimal Residual Disease )**

Der Begriff Minimale Resterkrankung, ursprünglich für hämatologische Erkrankungen beschrieben, findet auch bei dem Mammakarzinom Anwendung, weil bei dieser Erkrankung eine sehr frühe Tumorzeldisseminierung stattfindet.

Durch unterschiedliche Therapieansätze aus dem Bereich der Radio- und/oder Chemotherapie, sowie chirurgische Verfahren können hämatologische sowie solide Tumorerkrankungen in das Stadium der Vollremission gebracht werden. Der Begriff der Vollremission bezeichnet einen Zustand nach Therapie, bei dem mit den üblichen klinischen und apparativen Nachweisverfahren eine Resttumorerkrankung nicht mehr nachweisbar ist. Dennoch besteht bei vielen Patienten die Gefahr eines Rezidivs der Tumorerkrankung.

Anhand des initialen Tumorstadiums und des histologischen Befundes lässt sich aufgrund der langjährigen Therapieerfahrung beim Mammakarzinom (sowie bei hämatologischen Erkrankungen) die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs abschätzen. Bei Befall von mehr als 10 Lymphknoten liegt die 5-Jahresüberlebensrate trotz adjuvanter Chemotherapie bei etwa 29%. Basierend auf diesen Erkenntnissen wird heute eine stadienadaptierte Therapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom vorgenommen. Bei allen Tumorerkrankungen mit einem Rezidiv nach Vollremission, ist davon auszugehen, dass ein kleiner Teil der Tumorzellpopulation überlebt hat, diese allerdings dem Nachweis mit den klassischen Staging-Methoden entgehen. Diese Zellen und das damit in vielen Fällen verbundene Tumorzellrezidiv werden als Minimal Residual Disease (MRD) bezeichnet.

Man geht davon aus, dass diese Rezidive von okkulten Zellen ausgehen, die durch die konventionellen Methoden im peripheren Blut oder im Knochenmark nicht nachgewiesen werden können bzw. bei der autologen KMT auch von den akzidentell reinfundierten Tumorzellen ausgehen können. Für Autoren wie Fields (Fields et al 1996) und andere ist das Auftreten dieser residuellen Zellen ein prognostischer Faktor und scheint eine positive Korrelation mit der Rezidivhäufigkeit aufzuweisen. Durch die Entwicklung von Methoden zum Nachweis und Monitoring der residuellen Tumorzellen und deren Einsatz zur Diagnostik konnte die minimale Resterkrankung nachgewiesen werden.

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die derzeitigen Nachweisverfahren.

#### ***2.1.1 Nachweisverfahren für die Minimal Residual Disease***

Die heute angewandten bildgebenden oder zytologischen Methoden zur Verlaufsdagnostik bzw. zum Nachweis von Tumorzellrezidiven sind hinsichtlich ihrer Sensitivität limitiert. Als neue Methode weist die RT-PCR eine wesentlich höhere Sensitivität im Vergleich zu den vorangenannten Untersuchungen auf. Unter die gängigen Methoden fallen die Mikroskopische Pathologie, die Zytogenetik, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), der Southern Blot und die Immunzytochemie.

In der unten dargestellten Tabelle werden kurz die Nachweisverfahren hinsichtlich ihrer Sensitivität skizziert.

Tabelle1

Methoden	Untersuchte Struktur	Sensitivität
Mikroskopische Pathologie	Zellmorphologie	$10^1$ - $10^2$
Zytogenetik	Chromosomenanalyse	$10^2$
FISH	Genlokalisierung	$10^2$
Southern Blot	Genrearrangements	$10^2$
Immunzytochemie	Oberflächenantigene/ Oberflächenantikörper	$10^5$
Macs	Glykoproteine als Antigene/ Oberflächenantikörper	Variabel, $10^6$ - $10^8$
Zellkulturverfahren	Zellen mit klonogenem Potential	Variabel, bis $10^4$
RT-PCR	Ausgewählte DNA- Sequenzen	$10^7$

Die Lichtmikroskopie (Histologie, Zytologie) ist technisch einfach durchführbar; allerdings sind maligne Zellen, die weniger als 1-10% der absoluten Zellzahl ausmachen nicht nachweisbar. Die zytogenetischen Untersuchungen sind hinsichtlich ihrer Sensitivität der Lichtmikroskopie nicht überlegen, sie sind jedoch spezifischer, da eine Analyse der genetischen Struktur einen Rückschluss auf die Neoplasie zulässt.

Durch molekularbiologische Methoden wie die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung läßt sich eine Erhöhung der Sensitivität erzielen. Hierbei werden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden für charakteristische Sequenzabschnitte des Genoms benutzt, um so durch Hybridisierung und anschließende Darstellung mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht zu werden. Mittlerweile sind zahlreiche Sonden entwickelt worden, umso genaueren Aufschluss über die unterschiedlichen Sequenzen bei Malignomen zu bekommen. Die tumorspezifische Region wird mit einer Sensitivität von  $10^2$  erkannt. Eine andere Methode aus diesem Bereich ist der Southern Blot: Zunächst wird die DNA an spezifischen Stellen gespalten, durch Elektrophorese werden die einzelnen Fragmente voneinander getrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und anschließend mit der entsprechenden Hybridisierungssonde behandelt. Auf diesem Wege können chromosomale Translokationen und Genrearrangements als Hinweis auf residuelle Tumorerkrankungen detektiert werden. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methoden ist aber das Vorhandensein einer spezifischen, chromosomalen Struktur, was bei soliden Tumoren selten der Fall ist. Mit der Verbesserung immunologischer Methoden entstanden zwei neue Ansätze. Einerseits die Immunzytochemie und andererseits die immunomagnetische Zellseparation. Bei der Immunzytochemie macht man es sich zu Nutze, dass sich auf allen Epithelzellen epitheliale Zellmarker, sogenannte Oberflächenproteine, finden. Daher wurden verschiedene spezifische Oberflächenantikörper gegen tumorassoziierte Glykoproteine (z.B. ED8 von der menschlichen Brustkrebszelllinie H466B), Antikörper gegen Zytokeratine oder das epitheliale Membranantigen (EMA) hergestellt, die unter bestimmten Bedingungen an die Oberfläche der Tumorzellen binden. Die Auswertung erfolgt dann entweder licht- oder fluoreszenzmikroskopisch. Es bleibt anzumerken, dass die Auswertung durch den jeweiligen Untersucher beeinflusst wird.

Das Verfahren der immunomagnetischen Zellseparation bietet die Möglichkeit die Sensitivität der dargestellten Methoden zu erhöhen. Es werden magnetische Mikroartikel (magnetic beads) eingesetzt, die an monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene gekoppelt sind. Diese finden sich auch auf Tumorzellen epithelialen Ursprungs. Die Tumorzellen werden auf diese Weise markiert und durch immunzytologische Färbung visualisiert (Krüger et al, 1998). So wird zunächst die Dichte der Tumorzellen angehoben, und es besteht die Möglichkeit eine

weitere Untersuchung z.B. die Immunzytologie anzuschließen. Die Zellkultur stellt ein in vitro Verfahren dar, um disseminierten Tumorzellen mit klonogenem Potential zu amplifizieren. Den Proben werden bestimmte Flüssigmedien für 6 Wochen zugesetzt, dessen Zusammensetzung das Wachstum der Tumorzellen fördert (Joshi et al, 1990; Pantel et al, 1995). Abhängig vom Medium können lymphatische oder epiheliale Tumorzellen angereichert werden, während hämatopoetische Zellen eliminiert werden. Abzuwarten bleibt, in wie weit die in vitro Untersuchungen andere Ergebnisse als in vivo durch unterschiedliche Einflussfaktoren zeigen. In letzten Studien zeigte sich, dass keine höhere Sensitivität im Vergleich zu den bereits etablierten Verfahren erzeugt werden konnte (Krüger et al, 2003). Im Vergleich mit den bereits beschriebenen Methoden stellt die Polymerasenkettenreaktion derzeit die sensitivste Nachweismethode dar. Hierbei können kleinste Mengen spezifischer Nukleinsäuren nachgewiesen werden, entweder DNA oder, wie in dieser Studie, RNA.

## **2.2. Mammakarzinome**

### ***2.2.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms***

Das Mammakarzinom ist die weltweit dritthäufigste Tumorerkrankung. Beim Mammakarzinom kommt es relativ rasch zur Infiltration des Knochenmarks, bereits in 5-29% der Fälle ist das Knochenmark bereits frühzeitig infiltriert (Landys K.,1984). Diese Zellen können vermutlich in das periphere Blut gelangen und so zu einer Sekundärmetastasierung führen und somit die Prognose beeinflussen.

### ***2.2.2 Klassifikation des Mammakarzinoms:***

Die Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach histopathologischen Kriterien, entsprechend der Klassifikation der WHO „Classification on Histological Typing of Breast Tumors“ (1982, 2<sup>nd</sup> Edition). Hierbei werden die Mammakarzinome grob histologisch zunächst in nicht invasive und invasive Karzinome eingeteilt. Im Anschluss weiter differenziert entsprechend dem histologischen Typ. Das invasiv- duktales Karzinom kommt mit 65-80% am häufigsten vor. Um eine Stadieneinteilung der Mammakarzinomerkrankung festzulegen, erfolgt eine Einteilung nach TNM-Klassifikation. T gibt Auskunft über die Größe des Primärtumors, N über die Anzahl der befallenen Lymphknoten und M über das Vorliegen von Fernmetastasen. Das Tumorgrading wird nach einem System von Bässler durchgeführt, hierbei wird nach der Ausbildung der Kernpolymorphie und der Mitoserate unterteilt.

## Histologische Einteilung der Mammkarzinome:

<b>I. Nichtinvasive Karzinome:</b>
1. intraduktales Karzinom
lobulaeres Karzinoma in situ
<b>II. Invasive Karzinome:</b>
invasives duktales Karzinom
invasives duktales Karzinom mit ueberwiegend intraduktaler Komponente
invasives lobulaeres Karzinom
muzinoeses Karzinom
medullaeres Karzinom mit lymphoidem Stroma
papillaeres Karzinom
tubulaeres Karzinom
adenoid-zystisches Karzinom
sekretorisches (juveniles) Karzinom
apokrines Karzinom
<b>Karzinom mit Metaplasie:</b>
Plattenepithelkarzinom
Spindelzellmetaplasie
Knorpel- und Knochenmetaplasie
Mischtyp
<b>IV. Inflammatorisches Mammakarzinom:</b> sehr seltene Form, invasives Karzinom verbunden mit einer schlechten Prognose
<b>III. Pagetkarzinom der Mamille</b> ist eine Sonderform des duktales Karzinoms

### 2.2.3 Prognostische Faktoren

Als die vier wichtigsten prognostischen Faktoren gelten die Tumorgröße, der Differenzierungsgrad des Tumors, der Hormonrezeptorstatus und der Lymphknotenstatus.

Der Lymphknotenstatus ist der wichtigste prognostische Faktor. Ohne Lymphknotenbefall liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei 80%, im Vergleich dazu liegt bei Befall von mehr als 10 Lymphknoten die 5-Jahresüberlebensrate bei nur 29% (Beck et al, 2003). Ungefähr die Hälfte der operierten Patientinnen weisen einen axillären Lymphknotenbefall auf.

Im Bezug auf die Prognose gilt, dass Tumore unter 2 cm Größe (ohne Lymphknotenbefall) die beste Prognose haben; im Hinblick auf den Differenzierungsgrad unterscheidet man Grad 1 (hochdifferenziert) bis Grad 3 (undifferenziert) (Bloom and Richardson, 2003). Ein Tumor Grad 3 hat die schlechteste Prognose. Bestimmte Sonderformen wie tubuläre, muzinöse oder papilläre Karzinome haben eine deutlich bessere Prognose als das häufiger vorkommende duktales Karzinom.

Beim Hormonrezeptorstatus unterscheidet man Progesteron- bzw. Östrogen Rezeptor positive Tumore, die insgesamt, vor allem die progesteronpositiven, eine bessere Prognose aufweisen als die rezeptornegativen Tumoren.

Im Hinblick auf den histopathologischen Befund wird die Gruppe der medullären, tubulären oder muzinösen Tumoren als diejenige mit der höchsten 5-Jahresüberlebensrate und dem geringsten Lymphknotenbefall eingestuft. Die ungünstigste Prognose weist das

inflammatorische Karzinom auf mit einer 5-Jahresüberlebensrate < 5% unabhängig von der Therapieform.

#### **2.2.4 Minimale Resterkrankung beim Mammakarzinom**

Das Mammakarzinom wird heute bereits frühzeitig als eine systemische Erkrankung angesehen. Die häufigste Lokalisation der Metastasierung sind die Knochen und das Knochenmark. Im frühen Stadium ist bereits bei 5-29% der Patientinnen das Knochenmarks infiltriert (Landys K., 1982). Durch die Blutzirkulation gelangen Tumorzellen in den Kreislauf und können so Mikrometastasen bilden (Fidler, 1991). Im Knochenmark lassen sich Zellen epithelialen Ursprungs nachweisen, diese können vom Primärtumor stammen oder anderen Ursprungs sein. Nur ein gewisserer Anteil der Tumorzellen entwickelt ein Potential zur Proliferation und Teilung und kann so Mikrometastasen ausbilden. Dieser Tumorbefall des Knochenmarkes beeinflusst erheblich die Therapie und die Prognose.

#### **2.2.5. Therapieoptionen des Mammakarzinoms**

Die Primärbehandlung des Mammakarzinoms ist üblicherweise chirurgisch mit der Möglichkeit der modifizierten radikalen Mastektomie unter Mitnahme der axillären Lymphknotenpakete oder die brusterhaltende Operation mit sich anschließender Bestrahlung. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass für einen gewissen Anteil der Patientinnen die 5-Jahresüberlebensrate mit dieser Methode nicht vermindert war.

Eine isolierte postoperative Bestrahlung konnte die 5-Jahresüberlebensrate nicht steigern (NSABP Trial B-02), allerdings konnte die Rate der Lokalrezidive von 28% auf 8% gesenkt werden. Eine zweite Therapieoption ist die Chemotherapie. Die klassische Chemotherapie erfolgt bei dem Mammakarzinom nach dem CMF-Schema mit den Substanzen Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil mit insgesamt 6 Zyklen. In den letzten Jahren hat sich alternativ zum CMF-Schema bei nodal-positiven Patientinnen eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie nach dem FEC-Schema mit 5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid durchgesetzt. Für Niedrigrisikopatienten kann auch ein Versuch mit einer Monotherapie mit Epirubicin begonnen werden. (Chemotherapieregime in Abschnitt Methoden erläutert)

In Abhängigkeit vom Risikoprofil wird postoperativ eine adjuvante Chemotherapie, das heißt eine Chemotherapie, Hormontherapie oder die Kombination von beiden im Anschluss an eine Primärtherapie, angeschlossen. Für die Durchführung einer antihormonellen Behandlung ist Tamoxifen das Mittel der Wahl, es wird eine Ansprechrate von bis zu 60% beschrieben. Beide Modalitäten haben sich auch bei der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms bewährt.

### **2.3 Hochdosischemotherapie**

Nach konventioneller Therapie treten Rezidive auf, die von Tumorzellen ausgehen, die Chemo- oder Strahlentherapie überlebt haben (MRD). Ein experimenteller Therapieansatz, entweder zur Senkung der Rezidivrate oder zur Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms war in den neunziger Jahren die Durchführung einer sogenannten Hochdosischemotherapie mit nachfolgender Infusion autologen Knochenmarks oder peripherer Blutstammzellen. Die Hochdosistherapie mit autologer Progenitorzellreinfusion hat in frühen Publikationen zu einem rezidivfreiem Intervall von 2 ½ Jahren bei 70% der Patientinnen geführt. Im Vergleich dazu waren es nur 35% bei den Patientinnen, die mit konventioneller Chemotherapie behandelt wurden (Peters et al, 1993).

Das wesentliche Problem der Hochdosistherapie ist allerdings die Knochenmarkstoxizität. Eine Voraussetzung für diese Therapie ist daher der Ersatz des Knochenmarks nach der Therapie. Dies geschieht bei den Patientinnen mit Mammakarzinom durch Entnahme des patienteneigenen Knochenmarks vor Therapiebeginn und Reinfusion nach Abschluss der Hochdosistherapie (autologe Transplantation) zur Reetablierung der Hämatopoese. Alternativ können hierzu auch durch Wachstumsfaktoren mobilisierte, periphere Blutstammzellen benutzt werden. Beide Verfahren werden im folgenden Kapitel erläutert.

## 2.4. Knochenmarkstransplantation

### 2.4.1. Autologe Knochenmarkstransplantation (AKMT) oder autologe periphere Blutstammzelltransplantation (aPBSCT)

Das Verfahren der autologen Transplantation wurde in den achtziger Jahren entwickelt und fand in den neunziger Jahren breite Anwendung. Darunter versteht man die Reinfusion des patienteneigenen Knochenmarks (AKMT=autologe Knochenmarkstransplantation) bzw. der peripher gewonnenen Stammzellen (autologe periphere Blutstammzelltransplantation).

Das Knochenmark wird dem Patienten im Stadium der Vollremission und vor der myeloablativen Hochdosistherapie entnommen und in-vitro kryokonserviert. Nun ist die Applikation einer Hochdosistherapie bestehend aus Bestrahlungs- und Chemotherapie möglich, die ohne anschließende Reinfusion des Knochenmarks zu einer permanenten Knochenmarksaplasie führen würde. Die bei der autologen Knochenmarkstransplantation enthaltenen hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen führen zu einer deutlichen Verkürzung der zur Rekonstruktion der Hämatopoese benötigten Zeit (ca. 3 Wochen), Straka et al, 1997). Des Weiteren bietet die autologen Knochenmarkstransplantation gegenüber der allogenen Transplantation weitere Vorteile: es entfällt die Suche nach einem HLA-kompatiblen Knochenmarksspender und somit auch die Komplikation der GvHD. Als eindeutiger Nachteil der autologen KMT gegenüber der allogenen KMT stellt sich die mögliche Reinfusion von okkulten Tumorzellen durch das patienteneigene Knochenmark dar mit dem Folge eines Tumorrezidivs. Weitere Probleme ergeben sich bei vorbehandelten Patienten, wenn die Knochenmarksfunktion bereits vor Entnahme eingeschränkt oder andere Abnormalitäten aufweist, und es so nach Reinfusion zu einer protrahierten Regeneration oder unzureichenden Wiederaufnahme der Hämatopoese kommt.

Durch die neuere Möglichkeit der autologen Blutstammzelltransplantation können die Zellen nach vorangegangener Stimulation mit dem hämatopoetischen Wachstumsfaktor G-CSF weniger invasiv mittels Zytopherese im Vergleich zur Punktion des Beckenkamms bei der Knochenmarkspunktion gewonnenen werden. Die aPBSCT stellt daher auch eine Alternative bei im Beckenbereich bereits vorbestrahlten Patienten dar. Für die Gewinnung der peripheren Blutstammzellen ist keine Vollnarkose notwendig, und die Sammlung mittels Apherese kann an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen erfolgen und solange fortgeführt werden bis eine ausreichende Menge gesammelt wurde.

Außerdem kommt es bei ausreichender Verwendung von Blutstammzellen zu einer Regeneration der Hämatopoese bereits nach 2 Wochen, also etwa eine Woche schneller als beim Knochenmark. Das Ausmaß der Kontamination mit zirkulierenden Tumorzellen ist bei den peripheren Blutstammzellen geringer im Vergleich zum Knochenmark. Bisher konnte allerdings noch keine signifikanten Unterschiede in der Progressionsfreiheit nach Transplantation dargelegt werden.

Die **Entnahme des Knochenmarks** findet in Vollnarkose unter sterilen Bedingungen statt. Für einen erwachsenen Patienten werden im Schnitt  $2 \times 10^8$  Zellen/ kg Körpergewicht des Empfängers benötigt. Zur Gewinnung von **peripheren Blutstammzellen** werden diese

zunächst durch Wachstumsfaktoren wie G-CSF mobilisiert. Für eine autologe Transplantation sind mindestens  $2 \times 10^6$  CD 34 positive Zellen pro Kilogramm erforderlich. Anschließend werden die Stammzellen durch Leukapherese bei kontinuierlichem Blutfluss mittels eines Blutzell- Separators selektioniert und angereichert. Im Anschluss an die Hochdosischemotherapie mit oder ohne Bestrahlung werden dem Patienten über einen Zeitraum von 1-3 Stunden langsam das Knochenmark bzw. peripheren Blutstammzellen reinfundiert. Aufgrund der genannten Vorteile wurde das Verfahren der autologen Knochenmarkstransplantation zugunsten der autologen Transplantation G-CSF mobilisierter fast komplett verlassen. Die Zelle können in flüssigem Stickstoff über viele Jahre gelagert werden. Als Kryoprotektor findet DMSO, manchmal in Verbindung mit Hydroxyethylstärke, Verwendung (Tollerud et al, 1991).

## 2.5. Polymerasenkettenreaktion

Die Polymerasenkettenreaktion ist ein Verfahren zur in-vitro-Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen. Sie wurde von Kary B. Mullis 1983 (Mullis, 1990) entdeckt und Saiki et al. (Saiki et al, 1988) Mitte der 80er Jahre weiterentwickelt. Die Polymerasenkettenreaktion ermöglicht eine exponentielle Vervielfältigung definierter RNA- oder DNA-Abschnitte.

Im Hinblick auf die durchgeführten Experimente wurde die Entdeckung genutzt, dass verschiedene Tumoren unterschiedliche sogenannte Marker produzieren, deren m-RNA sich mittels der Polymerasenkettenreaktion vervielfältigen und somit nachweisen lässt.

Die Zahl der geeigneten m-RNA-Sequenzen ist steigend. Beschriebene Zielsequenzen für den Nachweis von Mammakarzinom Tumorzellen im Blut, im Knochenmark oder in den Lymphknoten sind Zytokeratin 19, CEA und Mammaglobin. Zytokeratin 20, Prostata-spezifisches Antigen und die Tyrosinase werden vor allem zum Nachweis von Tumorzellen bei Gastrointestinal-, Schilddrüsen- und Prostatatumoren, sowie Melanomen eingesetzt.

Verschiedene Autoren haben Arbeiten zur Eignung der Mammaglobin-message als Zielsequenz für die MRD- Diagnostik publiziert.

Mammaglobin wurde erstmals aus einem Adenokarzinom der Brust isoliert, wie sich aber herausstellte, wird es in verschiedenen Brustkrebsarten exprimiert. Sezerniert wird es nur von den Epithelzellen der reifen Brustdrüsen. Im Vergleich mit Brustgewebe von gesunden Frauen fanden sich bei an Brustkrebs erkrankten Patientinnen eine um das 10fach erhöhte Menge von Mammaglobin (Watson et al, 1996). Außer in Brustdrüsengewebe fand sich die Mammaglobinsequenz im Lipophilin AC, ein Protein der menschlichen Tränenflüssigkeit . Die Sequenz des Lipophilinanteils ist homolog mit der des Mammaglobins (24, Lehrer et al, 1998). Die gesamte Sequenz des Mammaglobin beträgt 500 bp; sie ist lokalisiert auf Chromosom 11q13 (Zach et al, 1999). Es fanden sich Übereinstimmungen mit der DNA-Sequenz von rPSC3 (exprimiert von der Prostata bei Ratten), hCC10 und rUg (exprimiert in verschiedenen Geweben wie Lunge, Uterus, Prostata und Brust). Man ordnet das Mammaglobin der Familie der Uteroglobine zu.

## 2.6. Diskussion der aktuellen Studien zur Mammaglobin-RT-PCR und zur Detektion der Minimal Residual Disease

Eine sehr umfangreiche Studie zur Detektion von Brustkrebstumorzellen im peripheren Blut mittels nested Mammaglobin-RT-PCR wurde 1999 von Zach (Zach et al, 1999) durchgeführt. Das Patientenkollektiv bestand aus 114 Brustkrebspatientinnen, aufgeteilt in 3 Gruppen: 18 bei Diagnosestellung, 53 im Tumorstadium I-III und 43 mit metastasiertem Brustkrebs. Das Kontrollkollektiv setzte sich aus 68 Patientinnen zusammen, davon waren 27 gesund, 41 Kontrollpersonen hatten andere Malignomen. Untersucht wurde ausschließlich peripheres

Blut im Gegensatz zu anderen Studien. Als Zusatzinformationen wurden noch der jeweilige CEA-Spiegel und Rezeptorstatus des Patienten ausgeführt. Mittels nested RT-PCR wurden die Proben untersucht. Zach erreichte in Verdünnungsreihen mit der Brustkrebszelllinie SKBR5 eine Sensitivität bis  $10^{6-7}$ . Von den untersuchten 114 Patientinnenproben waren 29 (25%) positiv für Mammaglobin. In den Negativkontrollen fanden sich 2 falsch-positive Proben, beides Tumorpatientinnen, eine mit einem Mantelzell-Lymphom, die andere mit einem Thymuscarcinom. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass die typische Region für ein Genrearrangement beim Mantelzell-Lymphomen im Bereich t(11;14)(q13;32) liegt. Einer Region, in der auch das Mammaglobin lokalisiert ist, so dass eine mögliche Translokation in diesem Bereich zur der Mammaglobin-Expression geführt haben kann. Nach Ansicht von Zach zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der Inzidenz von Mammaglobin und der klinischen Progression des Tumors, d.h. er konnte die meisten Proben mit positivem Resultat bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs (49%) und/oder erhöhten CEA-Spiegeln nachweisen. In einigen Fällen fand sich allerdings auch unter den Patientinnen ohne Tumorprogress ein positiver Nachweis von Mammaglobin in den Proben. Die Mammaglobin RT-PCR stellt für ihn im Vergleich mit anderen Markern wie CEA oder Zytokeratin 19, die auch von nicht malignen Zellen exprimiert werden können, und der Immunzytochemie, durch deren Antikörper, auch falsch-positive Ergebnisse erzielt wurden, eine Methode dar, die spezifisch Brustkrebszellen zu detektieren vermag. Die klinische Relevanz der Detektion von Brustkrebszellen mittels Mammaglobin-RT-PCR und die Möglichkeit, prognostische Rückschlüsse zu ziehen, gilt es in weiteren Studien zu klären. Kritisch merkt Zach an, dass die Expression des Mammaglobins abhängig ist von der jeweiligen Brustkrebsart und somit nicht unbedingt der Rückschluss gezogen werden kann, dass die Menge an Mammaglobin mit der Anzahl von Tumorzellen korreliert. Wie beschrieben stellt die Region, auf der das Mammaglobin-Gen lokalisiert ist, einen Bereich dar, der auch vermehrt bei anderen Tumoren wie Ösophagus-, Lungen- oder hepatozellulärem Carcinom amplifiziert wird. Es bleibt weiter abzuklären, ob durch diese Entdeckung falsch-positive Ergebnisse erklärt werden können bzw. die Mammaglobin-RT-PCR zur Detektion von residuellen Tumorzellen bei anderen Malignomen eingesetzt werden kann (Zach et al, 1999). Anzumerken bleibt, dass sich die Untersuchungen von Zach nur auf das periphere Blut von Brustkrebspatientinnen bezogen haben. Watson (Watson et al, 1999) hingegen untersuchte in einer Studie mittels Mammaglobin-RT-PCR im Vergleich zur CK19-RT-PCR 11 verschiedene Lymphknoten von Frauen mit metastasiertem Brustkrebs, und in einer zweiten Studie 15 aPBSC- Proben von Patientinnen nach Hochdosistherapie und aPBSCT. Als Resultat erbrachte die Cytokeratin 19-RT-PCR in 100% der Fälle positive Ergebnisse, bei allerdings auch positiven Negativkontrollen; 10 der 11 untersuchten Lymphknoten erbrachten ein positives Resultat bei Nachweis mittels Mammaglobin-RT-PCR. Bei den aPBSC-Proben waren 60% der Proben positiv. Unklar bleibt, ob in 40% der Fälle keine Tumorzellen enthalten waren oder die Expression von Mammaglobin zu schwach war. Watson zieht die Schlussfolgerung, dass sich Cytokeratine weniger für die Detektion von residuellen Tumorzellen eignen, da sie auch zum Teil von nicht- epithelialen Zellen gebildet werden, und so falsch-positiven Ergebnissen entstehen können. Von Mammaglobin verspricht er sich einen aussagekräftigen Marker vor allem zur Evaluation von aPBSC-Proben nach Cytokin-Stimulation oder nach Tumorzell- Purgung. Im Hinblick auf die Cytokeratin-19-PCR gibt es zwei weitere Studien von Krüger (Krüger et al, 1995) in der einen wurden 52 Knochenmark-, periphere Blut- und Stammzellproben von 35 Patientinnen mit Mammakarzinom in unterschiedlichen Krankheitsstadien untersucht. Die größte Anzahl an positiven Proben (60% im peripheren Blut und 75% im Knochenmark) fand sich in der Gruppe von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Unter den Negativkontrollen gab es keine positiven Proben. Krüger et al. kommen zu folgenden Ergebnissen, das gehäufte Auftreten von positiven Proben bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom zeigt einen Zusammenhang zwischen dem fortgeschritten

Tumorstadium und der Detektionshäufigkeit von Mikrometastasen. Um diesen Zusammenhang ausführlicher darzustellen, sollte das Patientenkollektiv erweitert werden. Insgesamt scheint die RT-PCR mit einer erreichten Sensitivität von  $10^{-6}$  der Immunzytochemie überlegen zu sein. Datta (Datta et al, 1994) veröffentlichten eine Studie zur CK19 RT-PCR mit 39 Proben und, es fanden sich im Bezug auf die untersuchten Knochenmarkproben von Patientinnen mit Mammakarzinom im Stadium IV vergleichbare Resultate wie bei Krüger.

Zippelius (Zippelius et al, 1997) und auch andere Autoren stehen der Anwendung der RT-PCR zur Detektion von Mikrometastasen kritisch gegenüber. Mittels der RT-PCR untersuchte er bei 53 Kontrollpersonen ohne epitheliale Tumoren und 53 Patienten mit Prostatakarzinom, sowie 10 Patientinnen mit Mammakarzinom 8 unterschiedliche Markergene im Knochenmark. Bei den eingesetzten Markergenen handelte es sich um EGP 40, Desmoplakin (epitheliale Adhäsionsmoleküle), CEA, erb-B2, erb-B3, PSA, PSM und CK18. Als Referenzuntersuchung in allen Fällen diente die Immunzytochemie mit monoklonalen Antikörpern gegen eine Auswahl an Cytokeratinkomponenten.

Nur die PSA-RT-PCR zeigte keine positiven Proben in der Kontrollgruppe, wie bereits von anderen Autoren vorbeschrieben. Bei den weiteren genannten Markern stellten sich in einem unterschiedlichen hohen Prozentsatz positive Ergebnisse in der Kontrollgruppe ein. Zippelius zieht daher die Schlussfolgerung, dass diese Marker entweder durchweg in jeder haemopoetischen Zelle exprimiert werden oder, in Bezug auf Cytokeratin 18, Pseudogene vorhanden sind bzw. eine nicht Gewebs-spezifische Expression stattfindet.

Der Einsatz von PSA als Marker beim Mammakarzinom blieb ergebnislos. Zippelius versuchte dieses mit folgendem Modell zu erklären, die sogenannten residuellen Tumorzellen befinden sich in einem „nicht-proliferativem Stadium“ im Knochenmark und exprimieren daher kein PSA, da diese Protease nur bei Proliferation von Brustkrebszellen gebildet wird. Als abschließendes Argument gegen den Einsatz einer RT-PCR führt Zippelius an, dass diese Methode in seiner Studie keine höhere Sensitivität gezeigt hat als die Immunzytochemie.

Ergänzend hierzu sollten noch Krismans (Krismann et al, 1995) Erwähnung finden. Mittels der CK19-RT-PCR untersuchte er 17 Lungenkrebszelllinien (bestehend aus 5 SCLC und 12 NSCLC Zelllinien) bei 50 Patientenproben und 65 Kontrollpatienten. 50% der Patientenproben erbrachten positive Ergebnisse für die CK19-RT-PCR; allerdings fanden sich unter den Kontrollproben 20% falsch-positive Ergebnisse. Dieses lässt Krisman zu folgendem Schluss kommen: Durch die offensichtlich von nicht-epithelialen Zellen ausgehende CK19-Expression sinkt die Spezifität der Methode und die Zahl der falsch-positiven Ergebnisse steigt, daher sollten die mit der CK19-RT-PCR erzielten Resultate im Hinblick auf Nachweis und Prognose mit Vorsicht behandelt werden. Die Ergebnisse von Krisman gleichen den von Zippelius angeführten Resultaten.

Um den Einfluss von Zytokinen bzw. mögliche weitere Störfaktoren auf die Ergebnisse der CEA- und der CK-19 RT-PCR zu untersuchen, führten Jung (Jung et al, 1997) 1997 ihre Untersuchungen fort. Hierzu wurden 22 Knochenmarkproben von Patienten mit epithelialen Abdominaltumoren und 16 Proben von Patienten mit chronischen Entzündungserkrankungen wie M. Crohn, chronischer Pankreatitis und Colitis ulcerosa untersucht. Als Negativkontrollen wurden Knochenmark- und Leukaphereseproben von gesunden Spendern und Patienten mit unterschiedlichen, nicht epithelialen Malignomen untersucht.

Die oben aufgeführten Patientenproben waren mit der CEA-RT-PCR in 69% der Fälle positiv, mit der CK19-RT-PCR in 50% der Fällen; übereinstimmende Ergebnisse fanden sich 64% der untersuchten Proben. Zusätzlich wurden auch die Knochenmarksproben von Patienten mit chronischen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes untersucht, hierbei fand sich ein vergleichbares Ergebnis zu den Proben der an Abdominaltumoren erkrankten Patienten. Unter den Negativkontrollen fand sich kein positives Resultat.

Desweiteren wurden mononukleäre Zellen von gesunden Knochenmarksspendern und mit G-CSF stimulierte Blutstammzellen von Patienten mit in Remission befindlichen Malignomen

bzw. von Patientinnen mit Mammakarzinom mit den Zytokinen SCF, G-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-3 und  $\gamma$ INF versetzt, über 7 Tage in einer Zellkultur gehalten und anschließend ebenfalls mit der RT-PCR untersucht. Die Resultate waren unerwartet. Zunächst negative Knochenmarksproben wurden nach 7-tägiger Kultivierung positiv mit der CK19-RT-PCR nachgewiesen, bei den Leukaphereseproben waren die Ergebnisse weniger beeindruckend. Im Gegensatz dazu blieben die mit der CEA-RT-PCR untersuchten Proben bis auf mit  $\gamma$ -INF stimulierte Ansätze negativ. Unter den mit G-CSF stimulierten Stammzellen von Patientinnen mit Mammakarzinom waren 100% positiv mittels der CEA-RT-PCR, 58% positiv mittels der CK19-RT-PCR und 50% positiv mittels der Immunzytochemie.

Jung (Jung et al) kommt nach diesen Resultaten zu folgenden Schlussfolgerungen: Wie auch in vorangegangenen Studien liegt die Vermutung nahe, dass durch Interferon oder den Tumornekrosefaktor, beides Zytokine der sogenannten Akuten-Phase einer Entzündungsreaktion, eine Expression der CEA- mRNA in Blutzellen induziert wird. Diese Annahme würde auch die positiven Ergebnisse mittels der CEA-RT-PCR unter den Proben von Patienten mit chronischen Darmerkrankungen erklären. Die sogenannte Up-Regulation scheint auf bestimmte Zytokine z.B.  $\gamma$ -INF begrenzt zu sein.

Im Hinblick auf die CK-19-RT-PCR und die positiven (falsch-positiven?) Resultate bzw. teilweise positiven Resultate nach Stimulation kommt Jung zu folgenden Erklärungsansätzen. Die CK19mRNA-Transkription wird begünstigt durch die Anwesenheit von stimulierten Stromazellen, zweitens die in den Proben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gefundene CK19mRNA wird induziert durch eine Interaktion zwischen Stromazellen und bestimmten Zytokinen und drittens, unter bestimmten in-vitro Bedingungen scheint eine CK-Transkription in haematopoetischen Vorläuferzellen möglich zu sein. Weitere Gründe für mögliche falsch-positive Resultate sind sogenannte Pseudogene und die Transkription bestimmter Markergene durch nicht-epitheliale Zellen. Insgesamt relativieren diese neueren Daten von Krüger die Ergebnisse von 1995. Die Einsatzmöglichkeit der RT-PCR im Bereich klinischer Screeningprogramme ist noch nicht in greifbare Nähe gerückt

Ein Vergleich der PCR-Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen ist aufgrund unterschiedlicher Protokolle, eingesetzter Proben und Primer bisher kaum möglich. Darüber hinaus kann die Bedeutung biologischer Störfaktoren, wie die Gen-Induktion, akzidentelle Pseudogenamplifikation oder eine Hintergrundtranskription noch abschließend beurteilt werden.

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1. Materialien**

##### ***3.1.1. Reagenzien und Chemikalien:***

- Ficoll Separating Solution ; Fa. Biochrom/Seromed, Berlin, Deutschland
- Erylyse Puffer    Ammonimchlorid  $\text{NH}_4\text{Cl}$  4,15g (=155mM)  
                           Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ ) 0,5 g(=10mM)  
                           EDTA 0,02 g (=mM)  
                           Aqua bidest. ad 500 ml (steril filtriert)
- Molecular Biology Grade Agarose ; Fa.Eurogentec, Seraing, Belgien
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glycogen, 20mg/ml for mol.biol. ; Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland
- Glutamin, 200mM ; Fa.Gibco BRL, Paisley, Schottland
- Natrium-Pyruvat, 100ml ; Fa. Gibco, Paisley, Schottland
- Fetale Calf Serum (FCS), 500ml ; Fa.Gibco, Paisley, Schottland
- Trypsin-EDTA, 100ml ; Fa.Gibco BRL, Paisley, Schottland
- Trypan Blue Stain 0,4% ; Fa.Gibco BRL, Paisley, Schottland

##### ***3.1.2. Labormaterialien***

- ART Sterifilter-Tips: 20E, 100E und 1000E, Fa.ART
- Cryo-Tubes, 1,8ml, Fa. NUNC, Roskilde, Dänemark
- Falcon-Röhrchen, 50 ml, Fa.Becton Dickinson, San Jose, USA
- Gewebekulturflaschen, 50ml, Fa.Greiner Labortechnik, Esslingen, Deutschland
- Gewebekulturflaschen, 250ml, Fa. NUNC, Roskilde, Dänemark
- High Density Printing Paper Typ 2, UPP-110HD, Fa. Sony, Köln-Ossendorf, Deutschland
- konische Röhrchen, 15ml, Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA
- Einmal-Kristallpipettenspitzen mit Wechseleinsatz, 0,5-10 $\mu$ l, Fa. Roth, Rilchingen-Hanweiler, Deutschland
- Sterile Pipetten Falcon (einzeln verpackt), 5 und 10ml, Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA

- Sterile Pipetten (einzeln verpackt), 10 und 25ml, Fa. Greiner Labortechnik, Esslingen Deutschland
- Einmal-Pipettenspitzen für PCR: 10,100 und 1000 $\mu$ l, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Safe-Lock (PCR-Tubes): 0,5ml, 1ml, 1,5ml und 2ml, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Sterile Filter, 25mm Porengröße 0,45 $\mu$ m, Fa. Millipore, Eschborn, Deutschland
- Suspensionskulturflaschen, 50ml, Fa. Greiner Labortechnik, Esslingen, Deutschland
- Suspensionskulturflaschen, 250ml, Fa. Greiner Labortechnik, Esslingen Deutschland

### 3.1.3. Geräte

- **Brutschrank: CO<sub>2</sub>-Schrank, Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland**
- Elektrophoresekammer Agargel Maxi, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
- Gel-Video-Dokumentationsanlage, Fa. MWG- Biotech, Eberswalde, Deutschland
- Mikroskope:
  - Lichtmikroskop Biomed, Fa. Leitz, Wetzlar, Deutschland
  - Auflichtmikroskop Wiloverths, Fa. Hund, Wetzlar, Deutschland
- Thermozykler für PCR:
  - UNO-Thermoblock,, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
  - T-Gradient, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
- Pipettierhilfen:
  - Pipetboy, Fa. Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
  - Accupipex, Assistent, Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
- Pipetten, Größen: 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l und 1000 $\mu$ l, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Spannungsquelle für Elektrophorese: Multi-Drive XL Power Supply, Fa. Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
- Spectralphotometer Uvicon, Fa. Kontron Instruments, Bissendorf, Deutschland
- Thermoblöcke:
  - Techne DRI-Block DB\*2A, (Fa. Techne Laboratory Equipment)

- Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Tischzentrifugen:
  - Tischzentrifuge Hettrich Miroliter, Fa. Wilke med-technik
  - Mikrozentrifuge, Modell 5415C, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- UV-transparentes Geltablett , 20x10cm und 20x20, mit Kammhalter, Fa.Biometra, Göttingen, Deutschland
- UV-Tisch Fluo-Link, Fa. ASG
- Wasserbad: Typ 1083, Fa.GFL
- Zellcounter: MDS Coulter-Counter, Krefeld, Deutschland
- Zentrifugen:
  - Heraeus Megafuge 1.0R, Fa. Heraeus, Osterode, Deutschland
  - Zentrifuge Sigma  $\delta$ K10, Fa. Sigma, Osterode, Deutschland

### 3.2. Tumorzellreihen:

Im Folgenden sind die verschiedenen Zellreihen aufgeführt, die mit der MG-RT-PCR, mit oder ohne Stimulation durch Zytokine, auf die Transkription von Mammaglobin untersucht wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden zum größten Teil von der American Type Culture Collection bezogen (ATCC) bezogen. Die Fibroblasten waren eine freundliche Gabe von Frau Dr. Johanna Brandner, Hautklinik, Universitätskrankenhaus Eppendorf. Die Kultivierung erfolgte in humidifizierter Atmosphäre mit 5% bei 37°C in verschiedenen Standardzellkulturflaschen.

Tabelle 2

MDA/MB-453, HTB-132	Fa.American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md., USA
HT 29, HTB-38	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md., USA
K562, CCL-243	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md., USA
Raji, CCL-86,	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md., USA
U937, CRL-1593,	Fa.American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md., USA
TF1, CRL-2003,	Fa.American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md., USA
HbMEC	
HuVEC, CRL-1730,	Fa.American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md., USA
Molt 15,	DSZM, Braunschweig
WSU-NHL,	DSZM, Braunschweig
MCF7, HTB-22,	Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md., USA
Fibroblasten,	Hautklinik, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

**-MDA/MB-453 Zellen:** (ATCC: HTB-131): Diese Zellen eines humanen metastasierten Mammakarzinoms wurden aus der Aszitesflüssigkeit einer an Brustkrebs erkrankten Patientin gewonnen und als Zelllinie etabliert.

Die Zellen wachsen adherent in MEM-Medium + FCS 10%; sie wurden einmal die Woche umgesetzt und einmal in der Woche gefüttert.

**-MCF7 Zellen:** (ATCC: HTB-22): Diese Zellen eines humanen Adenocarcinoms der Brust wurden aus dem malignen Pleuraerguß einer an Brustkrebs erkrankten Patientin gewonnen und als Zelllinie etabliert.

Die Zellen wachsen adherent in MEM-Medium + FCS 10%; sie wurden einmal in der Woche gefüttert und einmal pro Woche umgesetzt.

**-HL60 Zellen:** (ATCC: CCL-240): Diese Zellen einer Promyelozytischen Leukämie stammen aus dem peripherem Blut einer an dieser Leukämieform erkrankten Patientin und wurden so als Zelllinie etabliert.

Die Zellen wachsen inadherent in RPMI-Medium 1640 + FCS 10%; sie wurden alle 2-3 Tage neu in Suspensionkultur ausgesät abhängig vom jeweiligen Dichtwachstum.

**-U937 Zellen:** (ATCC: CRL-1593): Diese Zellen eines humanen histiozytären Lymphoms wurden aus dem malignen Pleuraerguß eines an histiozytärem Lymphom erkrankten Patienten gewonnen und als Zelllinie etabliert.

Die Zellen wachsen in Suspensionskultur und wurden alle 2-3 Tage neu ausgesät.

**-Raji Zellen:** (ATCC: CCL-86): Diese Zellen stammen von einem Burkitt-Lymphom des linken Oberkiefers eines 11-jährigen Jungen.

Die Zellen wachsen in Suspensionskultur und wurden alle 2-3 Tage umgesetzt.

**-TF-1 Zellen:** (ATCC: CRL-2003): Diese Zellen entstammen aus einem Knochenmarksaspirats eines japanischen Mannes mit Erythroleukämie. Für das Langzeitwachstum sind die Zellen auf den GM-CSF-Wachstumsfaktor angewiesen.

Die Zellen wachsen in Suspensionskultur und wurden alle 5- 7 Tage umgesetzt.

**-MOLT-15 Zellen:** (DSMZ, Braunschweig): Die Zellen stammen aus dem peripheren Blut eines Mannes mit T-Zell-Leukämie.

Sie wachsen in Suspensionskultur, allerdings sehr langsam und wurden nur alle 7 Tage umgesetzt.

**-WSU-NHL-Zellen:** (DSZM, Braunschweig): Die Zellen stammen aus dem Pleuraerguß einer Frau mit einem B-Zell- Lymphom. Die Zellen wachsen in Suspensionskultur. Die Zellen verdoppeln sich nur ca. alle 2 Tage.

**-K-562-Zellen:** (ATCC, CLL-243). Die Zellen wurden aus dem Pleuraerguß einer an einer CML erkrankten Frau gewonnen. Die Erkrankung befand sich in der terminalen Blastenkrise.

Die Zellen wachsen in Suspensionskultur und wurden alle 2-3 Tage umgesetzt.

**-HUVEC-Zellen:** (ATCC, CRL-1730): Die Zellen stammen aus menschlichem Nabelschnurblut. Sie weisen endothelialen Charakter auf.

Sie wachsen adhärent und werden alle 7 Tage umgesetzt.

### 3.3. Chemotherapieregime bei Patientinnen mit Mammakarzinom

In der Tabelle 2 sind zwei unterschiedliche, klinisch-experimentelle Protokolle dargestellt, die im Bereich der Chemotherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom im Universitätskrankenhaus Hamburg- Eppendorf seit 1993 im Rahmen einer Multicenterstudie eingesetzt wurden (Zander et al, 2004). Es wurden Patientinnen mit 10 oder mehr positiven Lymphknoten ohne Fernmetastasen entweder mit Standarddosischemotherapie oder Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation behandelt. Vorab wurde eine Mastektomie oder eine brusterhaltende Operation mit Resektion von axillären Lymphknoten durchgeführt.

Zum Teil wurden Proben von peripherem Blut, Knochenmark oder Leukapheresen dieser Patientinnen in der MG-RT-PCR zur Detektion von Mikrometastasen eingesetzt.

Tabelle 3

<b>Standarddosischemotherapie (SD-CT)</b>	<b>Hochdosischemotherapie (HD-CT)</b>
4 Zyklen Epirubicin (EC) 90 mg/m <sup>2</sup> plus Cyclophosphamid 600 mg/m <sup>2</sup>	4 Zyklen Epirubicin (EC) 90 mg/m <sup>2</sup> plus Cyclophosphamid 600 mg/m <sup>2</sup>
Im Anschluß 3 Zyklen CMF: Cyclophosphamid 500 mg/m <sup>2</sup> , Fluorouracil 600 mg/m <sup>2</sup>	Im Anschluß CTM: Cyclophosphamid 1500 mg/m <sup>2</sup> , Thiotepa 150 mg/m <sup>2</sup> und Mitoxantrone 10 mg /m <sup>2</sup> als Hochdosistherapie
Radiotherapie nach der Mastektomie und während der EC- Zyklen	Radiotherapie nach der Mastektomie
-----	Autologe Stammzelltransplantation
Tamoxifengabe, bei Hormonrezeptorpositiven Status (sowohl Östrogen- als auch Progesteron positiver Status)	Tamoxifengabe, bei Hormonrezeptorpositiven Status (sowohl Östrogen- als auch Progesteron positiver Status)

### 3.4. Methoden

#### **3.4. Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Der Anteil vitaler Zellen wurde mittels Zellcounter und Trypanausschluß in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Kultivierung erfolgte in verschiedenen Medien, die alle 14 Tage bis 3 Wochen neu angesetzt wurden. Alle Arbeiten an den Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank.

##### **3.4.1. Nährmedium**

Reagenzien für das Medium der Zelllinien MDA/MB, MCF 7, HBMEC und Fibroblasten

MEM Eagle, 500ml	Fa. Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. Gibco
L-Glutamin, 200mM	Fa. Gibco BRL
Natrium-Pyruvat , 100mM	Fa. Gibco

Das verwendete Medium wurde mit über Nacht im Kühlschrank aufgetautem, hitzeinaktiviertem 10% fetalem Kälberserum (FCS) , 5ml L-Glutamin 200mM und 5ml Natrium-Pyruvat supplementiert. Die Zusätze wurden mittels steril abgepackter Pipetten zugefügt. Das nun entstandene Nährmedium wurde im Kühlschrank aufbewahrt und für 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bevor es den Zelllinien zugesetzt wurde.

Reagenzien für das Medium der Zelllinien Raji, WSU, Molt 15, U937, K562, HL 60 und TF1

RPMI-Medium 1640 with L-Glutamine, 500ml	Fa. Gibco
Fetales Kälberserum (FCS) ,10%	Fa. Gibco
L-Glutamine, 200mM	Fa. Gibco BRL
Natrium-Pyruvat, 100mM	Fa. Gibco
Penicillin/Streptomycin-Lösung, 1%	Fa. Sigma

Dieses verwendete Medium wurde mit über Nacht im Kühlschrank aufgetautem, hitzeinaktiviertem, 10% Fetalem Kälberserum (FCS), 10ml L-Glutamine 200mM, 10ml Natrium-Pyruvat und 5ml Penicillin/Streptomycin-Solution 1% supplementiert.

Die Zugabe der Reagenzien erfolgte mittels steril abgepackter Pipetten. Das Medium wurde im Kühlschrank aufbewahrt und vor der Zugabe zu den Zelllinien im Wasserbad bei 37°C für 10 Minuten erwärmt.

### 3.4.2. Aussaat der Zelllinien

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Zelllinien wurden zunächst kurz bei Raumtemperatur, anschließend im Wasserbad bei  $30^{\circ}\text{C}$  angetaut und vor dem völligen Auftauen in ein steriles Gefäß überführt und mit 10ml RPMI- oder MEM- Medium versetzt.

Im Anschluss wurde das Gefäß kurz geschwenkt und dann für 10 Minuten bei 1400rpm zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet in 3ml Medium aufgenommen, in eine 50ml Gewebekulturflasche pipettiert und mit 2ml Medium aufgefüllt. Abhängig von der Zelllinie wurden die Zellen alle 2-3 Tage oder einmal in der Woche neu ausgesetzt bzw. umgesetzt. Die adhärent wachsenden Zellen wurden einmal in der Woche nach 4 Tagen Wachstum gefüttert und nach 7 Tagen neu ausgesetzt.

Der optimale Zeitpunkt zum Füttern der Zellen wurde einerseits mittels der Zellzahl, die bei ca.  $5 \times 10^6/\text{ml}$  liegen sollte, andererseits stellte der Farbwechsel des Mediums einen Indikator für den Verbrauch der Zellen und den gegenwärtigen Laktatgehalt des Mediums dar. Normalerweise hat das Medium eine rote Farbe. Ist das Medium pink, liegt ein alkalisches Milieu vor, das durch den Verbrauch von L-Glutamin und durch zu wenig  $\text{CO}_2$ -Zufuhr entsteht. Der Verbrauch des Mediums durch die Zellen wird angezeigt durch einen Farbwechsel des Mediums in eine gelbe Farbe. Diese ist durch ein Absinken des pH-Wertes aufgrund von sauren Stoffwechselprodukte z.B. Laktat zu erklären.

### 3.4.3. Abernten der lebenden Zellen

Hatten die Zellen in den 50ml Gewebekulturflaschen eine ausreichende Dichte erreicht bzw. hat das Medium die Farbe gewechselt, wurden sie geerntet.

Bei den **adhärent wachsenden** Zellen wurde das Medium aus den Gewebekulturflaschen abgezogen, anschließend wurden die konfluent gewachsenen Zellen vorsichtig mit 3ml PBS überschichtet und 10 Minuten zum Einwirken in den Brutschrank gelegt. Nach der Zeit wurde das PBS mit der Pipette abgezogen, im Anschluss wurden die Zellen mit 1ml Trypsin überschichtet, für 1-2 Minuten einwirken gelassen und das Trypsin wieder abgezogen. Für 15 Minuten wurden die Gewebekulturflaschen in den Brutschrank gestellt. Nach der Zeit wurden durch Klopfen die Zellen von der Wand der Gewebekulturflasche gelöst. Mit 2-3ml Medium wurden die restlichen Zellen abgewaschen und im Medium gelöst durch mehrfaches An- und Absaugen mit der Pipette.

Nun wurden die Zellen auf die 3 vorbereiteten Gewebekulturflaschen verteilt, die 15ml Medium gefüllt waren. Jeder Gewebekulturflasche wurden 3 (bei MDA/MB und MCF7) bzw. 5 (bei HT29) Tropfen aus der Pipette zugesetzt und die Flaschen vorsichtig geschwenkt, dann wurden sie in den Brutschrank gelegt für die nächsten 7 Tagen bis zum nächsten Umsetzen.

Die in **Suspensionskultur (Raji, K562, U937) sehr schnell wachsenden Zellen** mussten 2-3mal in der Woche umgesetzt werden. Dazu mussten 10ml aus der Flasche mit Suspensionskultur abpipettiert werden und in ein blaues Falconröhrchen überführt werden. Im Anschluß wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt und die Falconröhrchen in der Zentrifuge bei 1400rpm für 10 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen konnten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für die weitere Verarbeitung eingefroren werden. Die verbleibenden Zellen in der Suspensionskultur wurden mit 10ml frischem Medium neu aufgefüllt.

**Langsam in Suspensionskultur wachsende Zellen wie Molt 15, WSU und TF1** wurden alle 5-6 Tage umgesetzt nach dem gleichen Verfahren wie oben, lediglich wurde die gesamte Suspensionskultur abgezogen, pelletiert und neu in Medium aufgelöst.

### 3.4.4. Zellzählung

Die **Bestimmung der Zellzahl** erfolgte mittels des Coulter-Counters. Zur Unterscheidung der aktiven von den vitalen Zellen wurden die Zellen mittels Trypanblau gefärbt. 25µl Trypanblau wurden mit 50µl der Zellsuspension auf einer Mikrotiterplatte zusammenpipettiert und vorsichtig durchmischt. 20µl der Mischung wurden auf die Neubauer-Kammer aufgetragen, nach einer Minuten wurden alle nicht-gefärbten Zellen der 4 Großquadrate ausgezählt. Der saure Farbstoff Trypanblau färbte nur die aktiven nicht die vitalen Zellen an, so dass eine Unterscheidung möglich war.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mittels folgender Gleichung:

$$\text{Zellzahl}/4 = \text{Ergebnis} \times 1,5 = \text{Ergebnis} \times 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

### 3.4.5. Einfrieren lebender Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in Portionen von  $1-2 \times 10^7$  in Kryoröhrchen überführt. Dafür wurden 40ml FCS und 4ml DMSO als Einfriermedium vorsichtig durchmischt, anschließend wurde das Zellpellet in 3ml Einfriermedium (5% Dimethylsulfoxid) aufgenommen, in das Kryoröhrchen überführt und sofort bei  $-80^\circ\text{C}$  für 3 Tage tiefgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Kryoröhrchen im Stickstofftank bei  $192^\circ\text{C}$  gelagert.

## 3.5. Gewinnung humaner Leukozyten aus peripherem Blut (Ficoll- Gradienten-Separation)

Mit Hilfe der Dichtezentrifugation über den Ficollgradienten wird, wie von Soeth (Soeth et al, 1996) beschrieben, die mononukleäre Zellfraktion als Probenmaterial isoliert. Es wird durch dieses Verfahren die weitgehende Entfernung von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten erreicht.

Reagenzien:

Ficoll Separating Solution	Fa. Biochrom/Seromed
PBS Dulbecco's	Fa.Gibco BRL, Paisley, Schottland

Bei der Ficoll-Lösung handelt es sich um ein Polysaccharidgemisch. Die Gewinnung der humanen Leukozyten aus dem Knochenmark oder peripheren Blut erfolgt über den Ficoll-Gradienten. Durch die Zentrifugation der Blut- bzw. Knochenmarksprobe bei 1400rpm kommt es zu einer Trennung der mononukleären Zellen von den Erythrozyten aufgrund der höheren Dichte der Erythrozyten. Im Reaktionsgefäß bilden sich verschiedene Phasen aus. Die mononukleären Zellen reichern sich zwischen Ficoll und Serum in der Mitte des Reaktionsgefäßes an; die Erythrozyten hingegen bilden zusammen mit Zelltrümmern den Bodensatz, der abzentrifugiert wird.

Mittels der Ficoll-Methode können aus 1ml Blut, das vorher durch Zugabe von EDTA oder Natriumcitrat ungerinnbar gemacht wurde, ca.  $10^6$  Leukozyten gewonnen werden.

1. Für diese Art der Zellseparation werden zunächst 20ml der Blutprobe in ein 50ml-Zentrifugationsröhrchen gegeben, mit 20ml  $4^\circ$  kaltem PBS aufgefüllt und kurz vorsichtig durchmischt.

2. In einem weiteren 50ml-Zentrifugationsröhrchen werden 15ml Ficoll vorgelegt und vorsichtig mit 40ml des PBS-Blut-Gemisches überschichtet.
3. Bei 1400rpm wird 30min in der Megafuge 1.0R (Heareus) ohne Bremse zentrifugiert, bis eine deutliche Auftrennung der verschiedenen Zellen erfolgt ist.
4. Nach der Zentrifugation wird die Hälfte der oberen wässrigen Schicht abpipettiert; danach wird mit der anderen Hälfte der oberen wässrigen Schicht sorgfältig die mittlere Trennschicht, die aus den Leukozyten besteht, mit einer 5ml-Pipette abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
5. Zum Waschen der Leukozyten wird das Reaktionsgefäß auf 50ml mit 4°C kaltem PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert bei 1400rpm für 10min ohne Bremse.
6. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet wird in 5-7ml PBS resuspendiert und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei 4° C gelagert.
7. Die Zellen können nun gezählt werden, für Verdünnungsreihen verwendet werden oder zur DNA-Gewinnung verwendet werden.

### **3.6. Verdünnungsreihen**

Zur Bestimmung der Sensitivität der Mammaglobin- RT-PCR wurden Verdünnungsreihen aus den Mammarkarzinomzelllinien hergestellt. Hierfür wurden die Tumorzelllinien MCF7 und MDA/MB 453 sowie die gewonnenen, mononukleären Zellfraktion des Buffy Coats verwandt. Es wurden Verdünnungsstufen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$  hergestellt. Jeder Reaktionsansatz enthielt  $2 \times 10^7$  Zellen. Ziel der Verdünnungsreihen war es die Tumorzell dissemination im Knochenmark in vitro zu simulieren.

#### **Materialien:**

Buffy Coat (1Beutel)

Tumorzelllinien : MCF7 und MDA/MB

PBS

Ficoll

Trypsin

Sterile Reaktionsgefäße ( E-cups der Firma Eppendorf, 1,5ml)

#### **Durchführung:**

1. Buffy Coat ficollisieren und waschen; anschließend im Zellcounter die Zellzahl bestimmen und auf eine Zellzahl von  $1,98 \times 10^7$  Zellen/E-cup für die  $10^{-2}$  Verdünnung einstellen, alle übrigen Verdünnungen werden mit  $1,8 \times 10^7$  mononukleäre Zellen/E-cup pipettiert.
2. Vorbereitung der Tumorzelllinien: das Medium wird abgezogen und die Zellen werden mit 1-2ml Trypsin überschichtet, danach wieder in Medium aufgenommen. Im Zellcounter wird die Zellzahl bestimmt und eine Zellzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen berechnet.
3. In alle E-cups wird nun die errechnete Menge ( 2 bzw.  $1,8 \times 10^7$  Zellen) gegeben.
4. Zu der Buffy Coat Menge im ersten E-cup wird die errechneten Menge an Tumorzellen ( $2 \times 10^5$  Zellen) pipettiert. Hierdurch wird der erste Verdünnungsschritt erreicht  
→  $10^{-2}$  Verdünnung.
5. Aus dem ersten E-cup 1/10 der gesamten Menge ( $0,2 \times 10^7$  Zellen) entnehmen und in das zweite E-cup überführen (gesamt  $2 \times 10^7$  Zellen)→  $10^{-3}$  Verdünnung.

6. Aus dem zweiten E-cup 1/10 der gesamten Menge entnehmen und in das dritte E-cup überführen →  $10^{-4}$  Verdünnung. In dieser Art weiterverfahren bis eine  $10^{-8}$  Verdünnung erreicht ist.
7. Zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten die Zellen jeweils gut durchmischen durch vortexen oder mehrfaches pipettieren.
8. Wenn die Verdünnungsreihe fertiggestellt ist, die Zellen bei 1500rpm für 20 Minuten bei  $20^{\circ}\text{C}$  zentrifugieren, den Überstand dekantieren.
9. Nun können die hergestellten Zellreihen entweder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden oder im weiteren Verlauf zur RNA-Extraktion eingesetzt werden.

### **3.7. Präparation von RNA**

#### **3.7.1 RNA-Extraktion:**

Bei der RNA-Extraktion können einige Störfaktoren auftreten, daher kann die Extraktion der RNA nur unter geeigneten Reaktionsbedingungen durchgeführt werden. Die Isolierung der RNA in dieser Studie erfolgte mittels der TRIzol-Methode modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski et al, 1987). Zunächst wurden die Pellets durch den Zusatz von RNazol Reagenz homogenisiert. Nach Zugabe von Chloroform und Zentrifugation entstanden 3 Phasen: die obere wässrige Phase mit Total-RNA, eine mittlere weißliche Phase, die Proteine enthält und eine untere rötliche Phase mit genomischer DNA. Eine geringfügige Verunreinigung durch genomische DNA ist bei dieser Methode daher unvermeidlich.

#### **Materialien und Reagenzien:**

RNA Isolation Kit ; Fa. Stratagene, La Jolla, USA  
 RNA Midi Kit ; Fa. Qiagen  
 RNazol™B Kit ; Fa. WAK-Chemie Medical GmbH , Bad Soden, Deutschland  
 Chloroform  
 Isopropanol  
 Glykogen  
 Ethanol per analysis 75%  
 DEPC-H<sub>2</sub>O

#### **Reaktionsansatz:**

##### **1. Homogenisierung**

Die Zellpellets zu je  $2 \times 10^7$  Zellen wurden in jeweils 2000  $\mu\text{l}$  RNazol mit der Pipette aufgenommen, kurz auf- und abpipettiert, im Anschluss in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Der Ansatz wurde kurz gevortext, bis er sich vollständig gelöst hatte. Die Proben wurden kurz auf Eis gelagert.

##### **2. RNA-Extraktion**

Jeder RNA-Probe wurde 200 $\mu\text{l}$  Chloroform unter dem Chemikalienabzug zugesetzt. Die Proben wurden dann gevortext, bis sich eine milchige Trübung einstellte. Im Anschluss Kühlung der Reaktionsansätze für 5 Minuten auf Eis. Zentrifugation für 20 min bei maximaler Umdrehungszahl (10000 upm) und  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3. Präzipitation

Die oberste, wässrige Schicht aus dem Falcon-Röhrchen wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. 500µl Isopropanolol wurde dem Überstand zugesetzt.

Zum Anfärben der RNA in der vorliegenden Probe wurden dem Gemisch 2,5 µl Glykogen zugefügt und ausreichend vermischt.

Die Proben mussten nun für mind. 30 min oder konnten bis zum nächsten Tag bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden. Nach diesem Vorgang wurden die Proben für 30 min bei maximaler Umdrehungszahl (6000 upm) und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert.

Erwünscht war ein helles Pellet, das sich am Boden des Reaktionsgefäßes ablagerte.

### 4. RNA-Waschvorgang

Nach der Zentrifugation wurde der wässrige Überstand dekantiert und 750 µl Ethanol wurden zugesetzt. Die Proben wurden erneut für 20 min bei maximaler Umdrehungszahl (6000 upm) und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt.

Der verbliebene Überstand wurde dekantiert und die Pellets bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Im Anschluss wurden die Pellets abhängig von der Größe in 30-50µl DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1%) gelöst und für 10 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  im Heizblock inkubiert.

5. Nach dieser Inkubation wurden die Proben kurz auf Eis gekühlt. Die so gewonnene RNA konnte gleich der Reversen Transkription zugeführt werden oder bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren werden.

#### 3.7.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung der RNA und um die Integrität und Qualität der gewonnenen RNA sicherzustellen, erfolgte die photometrische Messung bei 260, 280 und 320 nm. Hierzu wurden 4µl der gelösten RNA mit 396 µl 1\*TE-Puffer aufgefüllt. Die Messung des RNA-Gehaltes erfolgt anschließend im Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm.

Um die Reinheit abzuschätzen wurde zusätzlich die  $A_{260/280}$  und  $A_{260/320}$  Ratio bestimmt.

Die Konzentration der RNA in µg/ml berechnete sich nun aus dem Ausdruck:

RNA-Konzentration (µg/µl) =  $OD \cdot 40 \cdot 100 / 1000$

### 3.8. Die Reverse Transkription und die Polymerasenkettenreaktion

Das Verfahren der Polymerasenkettenreaktion wurde 1985 von Kary Mullis entdeckt (A.Rolfs 1992) und von Saiki et al. Mitte der 80er Jahre weiterentwickelt (Saiki et al, 1988). Daher ist es heute möglich ist innerhalb kürzester Zeit eine exponentielle Vervielfachung definierter DNA-Abschnitte zu erreichen. Die Kombination der Reversen Transkription und Polymerasenkettenreaktion ermöglicht die in-vitro-Amplifikation definierter RNA-Abschnitte und kann somit zum Nachweis von minimalen Tumorzellen eingesetzt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Methode der RT-PCR wird von den meisten Autoren als sensitivere Methode im Vergleich mit der PCR angesehen. Man macht sich hierbei die Fähigkeit der RNA-abhängigen DNA-Polymerase aus einem Moloney Murine Leukämie Virus stammend zunutze, anhand der mRNA einen komplementären DNA-Strang (cDNA) zu synthetisieren. Das Murine Virus besitzt ein Temperaturoptimum im Bereich von  $37^{\circ}\text{C}$ , bei dem es die maximale Aktivität entfaltet. So kann cDNA in voller Länge synthetisieren werden. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor ist ein leicht basisches pH-Milieu und eine optimale KCl-Konzentration. Die entstandene cDNA wird nun in einer sogenannten nested PCR exponentiell vervielfacht. Die hierbei eingesetzten Taq-Polymerase ist ein Enzym, das aus einem Bakterium namens *Thermus aquaticus* gewonnen wird. Da dieses Enzym sehr hitzestabil ist, das Temperaturoptimum liegt bei  $75-80^{\circ}\text{C}$ , verliert es nur

geringfügig an Aktivität trotz der maximalen Temperaturen, die zur Denaturierung der DNA-Stränge erforderlich sind und kann so die PCR-Zyklen ausreichend oft wiederholen.

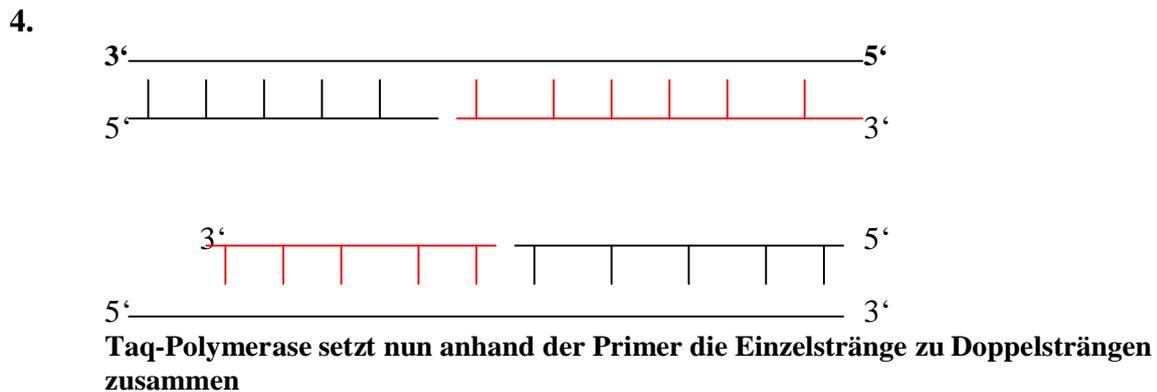
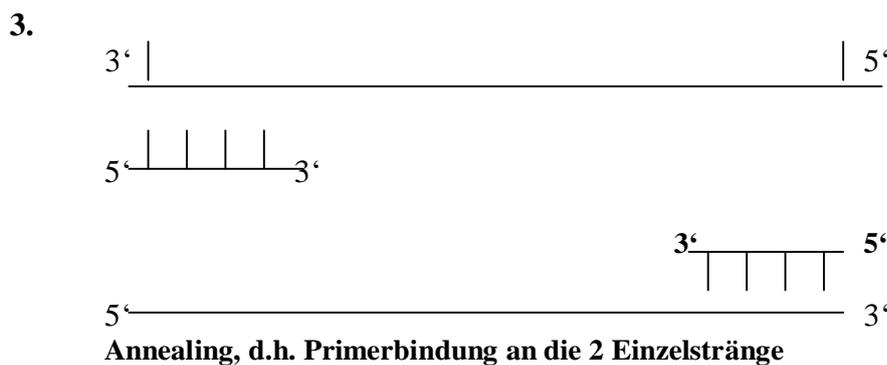
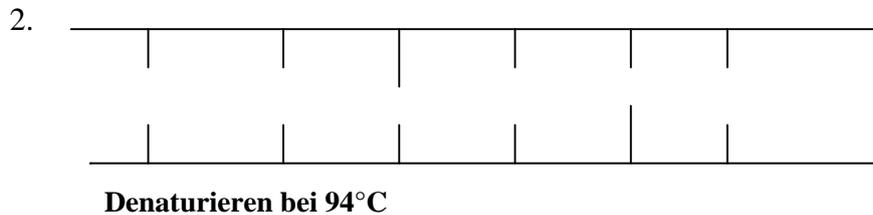
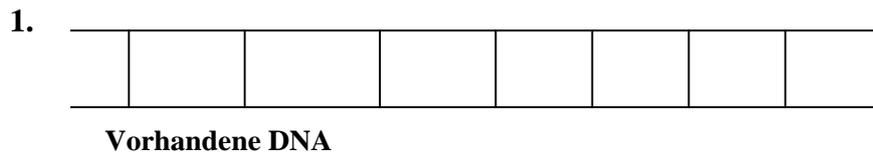
Es besitzt des weiteren die Fähigkeit anhand der vorliegenden DNA- Matrize die Elongation eines DNA- Primers, der sich als komplementäres Oligonukleotid bereits dem DNA-Strang angelagert hat, fortzuführen.

Die Besonderheit der nested-PCR, die bei den Untersuchungen verwandt wurde, liegt darin, dass die für die erste Amplifikation eingesetzten DNA-Primer zunächst die beiden äußeren Exons der gesuchten Sequenz überspannen bzw. flankieren. Die so amplifizierte DNA wird dann zu einem bestimmten Anteil einer 2. Amplifikationsrunde zugeführt. In diesem 2. PCR-Zyklus wird nun das zweite Primerpaar eingesetzt wird, d.h. diese Primer binden innerhalb der DNA-Fragments, das vom Primerpaar aus der ersten Runde vorgegeben wurde. Diese Methode bietet einerseits eine hohe Sensitivität (A. Rohlf's et al, 1994), allerdings, da zwei getrennte PCR-Zyklen ablaufen müssen, auch das Risiko einer vermehrten Probenkontamination.

Die beiden Zyklen laufen nun nach folgendem Schema ab: Nach einer Denaturierung der DNA-Stränge erfolgt im ersten PCR-Zyklus die Anlagerung der synthetisch hergestellten „äußeren Primer“ an definierten Stellen der DNA-Sequenz und anschließend eine Verlängerung des Oligonukleotids mit Hilfe der Taq-Polymerase durch Einbau der hinzugefügten Nukleotide. Dieser Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden. Nun schließt sich ein zweiter PCR-Zyklus an, bei dem ein bestimmter Anteil der amplifizierten DNA aus dem ersten Zyklus eingesetzt wird. Er läuft nach dem gleichen oder einheitlichen Schema ab wie der erste PCR-Zyklus. Mittels der Gelelektrophorese und der Ethidiumbromidfluoreszenz werden die DNA-Fragmente dargestellt und sichtbar gemacht und so die jeweilige Fragmentgröße bestimmt.

Die im Folgenden aufgeführte Mammaglobin- RT-PCR wurde auf Grundlage der Ausführungen von Zach (Zach et al, 1999) entwickelt und hinsichtlich Sensitivität und Spezifität optimiert (. Bei den eingesetzten Primern wurden die von Zach (Zach et al, 1999) veröffentlichten Primer verwandt; nur bei Mammaglobin 4 zeigte sich ein Unterschied in einer Base.

### 3.8.1. Abbildung zum Reaktionsablauf



### 3.8.2. Ansatz der Primer

Die gewünschte Primerkonzentration ( bezogen auf 50µl Volumen pro PCR-Ansatz berechnet) berechnete sich nach folgender Gleichung:

$$1 \text{ pmol} / \mu\text{l} = 1 \mu\text{mol} / \text{l}$$

Die Primer wurden bezogen von der Firma Gibco BRL. Zunächst musste aus der Trockensubstanz eine Stocklösung hergestellt werden, indem man die vom Hersteller in der Anleitung empfohlene Menge an DEPC-H<sub>2</sub>O dazugab, anschließend vortexte und kurz zentrifugierte.

Danach wurde aus der Primer -Stocklösung eine Arbeitslösung hergestellt durch eine 1:10 Verdünnung der Stocklösung mit DEPC-H<sub>2</sub>O; aus dieser wurde die endgültige Arbeitslösung durch eine weitere 1:10 Verdünnung.

Diese wurde erneut gevortext, abzentrifugiert und dann bis zum weiteren Gebrauch entweder bei -20° C gelagert oder direkt für den PCR-Mix verwendet.

Für jeden Mammaglobin -PCR-Ansatz wurden 2,5µl der Arbeitslösung eingesetzt.

Für jeden GAPDH -PCR-Ansatz wurden 10µl der Arbeitslösung eingesetzt.

GAPDH wurde als Kontrolle eingesetzt, um zu überprüfen, ob die beiden PCR-Zyklen regelrecht durchgeführt wurden. Bei GAPDH handelt es sich die Glyceraldehyde 3-Phosphate-Dehydrogenase, ein Enzym, das an der Glykolyse beteiligt ist. Es wird in fast allen Geweben exprimiert und daher auch als ein sogenanntes „house-keeping-gen“ bezeichnet.

### **3.8.3. Reverse Transkription:**

Die in der Extraktion isolierte mRNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

#### **Materialien:**

First strand cDNA RT Kit ; Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland

#### **Reagenzien:**

First Strand cDNA Synthesis Kit ( Fa. Amersham Pharmacia Biotech):

Bulk First-Strand cDNA Reaction Mix: FPLCpure Murine Reverse Transcriptase  
 RNAGuard (porcine)  
 RNase/DNase-Free BSA  
 dATP  
 dCTP  
 dGTP  
 dTTP

DTT Solution: 200 mM

Pd(N)<sub>6</sub> Primer : 0,2 µg/µl, Random Hexadeoxynucleotides

RNase- freies Wasser, behandelt mit Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)

#### **RT-Ansatz (1µgRNA) :**

Vorbereitung: einen Heizblock auf 65° vorheizen, einen weiteren auf 37° vorheizen

1. RNA-Probe (1µg) in ein e-Cup pipettieren  
 und Zugabe von RNase- freiem Wasser zu den RNA-Proben :  
 RNA-Proben mit Volumina bis 8 µl: mit RNase-freiem Wasser auf 8 µl auffüllen  
 RNA-Proben mit Volumina größer 8 µl: mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl auffüllen
2. RNA-Probe für 10 min. bei 65°C inkubieren, dann auf Eis kühlen.
3. Bulk First-Strand cDNA Reaction Mix auftauen, danach vortexen

#### 4. Reaktionsansatz:

Tabelle 3

RNA (1µg)	Bulk First-Strand Reaction Mix	Primer	DTT Solution	Endvolumen des Reaktionsansatzes
8 µl	5 µl	1 µl	1 µl	15 µl
20 µl		1 µl	1 µl	33 µl

Zu der 8µl Probe 7µl Reaktion-Mix geben.

Zu der 20µl Probe 13µl Reaktionsgemisch geben.

5. Den Ansatz zum Durchmischen mehrmals mit der Pipette an-und absaugen.

6. Das Reaktionsgemisch für 1 Stunde bei 37°C inkubieren.

7. Das cDNA-Reaktionsprodukt kann entweder sofort in der PCR amplifiziert werden oder bis zur weiteren Verarbeitung bei – 20° C tiefgefroren werden.

#### 3.8.4. Polymerase-Ketten-Reaktion:

Bezug der Materialien

RT-PCR-Kit ; Fa. Perkin Elmer, Branchburg, USA

PBR 322 DNA/BsuRI (Hae III), Marker 5 ; Fa. MBI Fermentas

#### Reagenzien :

GeneAmp 10x PCR Puffer:	100 mM	Tris-HCl, pH 8,3
	500 mM	KCl
	15 mM	MgCl
	0,01% (w/v)	Gelantine

dNTP-Mix

AmpliTaq DNA Polymerase                      5 U/µl

#### 3.8.5. Primer:

Mammaglobin-Primer ; Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland

Sequenzen:

Mammaglobin 1: 5' GAA GTT GCT GAT GGT CCT CAT GCT GGC 3'

Mammaglobin 2 : 5' CTC ACC ATA CCC TGC AGT TCT GTG AGC 3'

Mammglobin 3 : 5' CTC CCA GCA CTG CTA CGC AGG CTC 3'

Mammaglobin 4 : 5' CAC CTC AAC ATT GCT CAG AGT TCA TCC G 3'

GAPDH-Primer ; Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland

Sequenzen:

GAPDH 1: 5' CTG AGA ACG GGA AGC TTG TC 3'

GAPDH 2: 5'AGG TCA GGT CCA CCA CTG AC 3'

**PCR-Ansatz ( 50µl ), 1. Zyklus :**

<b>GAPDH:</b>	7,5 µl	Template DNA
	5 µl	10x Puffer
	4 µl	dNTP-Mix ( 1,25 mM )
	10 µl	GAPDH 1
	10 µl	GAPDH 2
	0,33 µl	Taq Polymerase ( 5 U/µl )
	13,17 µl	dd H <sub>2</sub> O

<b>Mammaglobin :</b>	4 µl	Template DNA
	5 µl	10x Puffer
	4 µl	dNTP-Mix ( 1,25 mM )
	2,5 µl	MG 1
	2,5 µl	MG 2
	0,33 µl	Taq Polymerase ( 5 U/µl )
	34,67 µl	dd H <sub>2</sub> O

**PCR –Ansatz, 2. Zyklus :**

<b>Mammaglobin :</b>	2 µl	Template DNA
	5 µl	10x Puffer
	4 µl	dNTP-Mix ( 1,25 mM )
	2,5 µl	MG 3
	2,5 µl	MG 4
	0,33 µl	Taq Polymerase ( 5 U/µl )
	36,67 µl	dd H <sub>2</sub> O

Folgendes dargestelltes **Temperaturschema** hat sich als optimal für die PCR erwiesen:

Initiales Denaturieren: bei 94°C für 4min

Amplifikationszyklus (40 Zyklen):

Denaturierung: bei 94°C für 1min

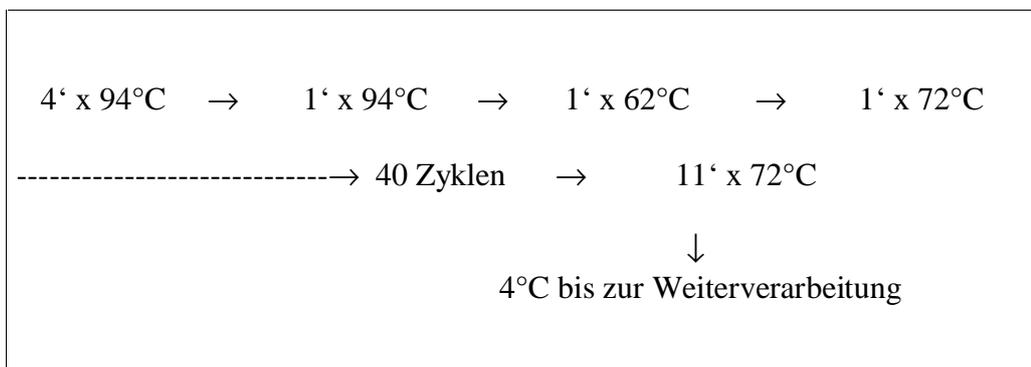
Anlagerung: bei 62°C für 1min

Extension: bei 72°C für 1min

Termination:

Finale Extension: bei 72°C für 11min

Stop-Temperatur: 4°C bis zur Weiterverarbeitung



### 3.9. Agarose- Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurde mittels der Agarose- Gelelektrophorese und Zugabe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

#### Reagenzien:

**Agarose:** **Molekular Biology Grade Agarose; Fa. Eurogentec**

TAE-Puffer (50x):	242g Trisbase 57,1ml Eisessig 100ml 0,5M EDTA auf 1l mit Aqua bidest. auffüllen anschließend verdünnen : 20ml 50% TAE-Puffer mit 1980ml H <sub>2</sub> O, so daß eine 0,5% TAE-Puffer-Lösung entsteht.
-------------------	--

Ethidiumbromid (10mg/ml):	1g Ethidiumbromid ; Fa. Gibco  100ml Aqua bidest.
---------------------------	---

6x Schwerepuffer:	0,2% (w/v) Bromphenolblau  0,2% (w/v) Xylen Cyanol FF  60% (w/v) Glycerin
-------------------	---

PBR 322 DNA/Bsu RI (HAE III), Marker 5 ; Fa. MBI Fermentas
--

Die DNA -Fragmente wurden je nach Basenpaargröße in dem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Zunächst wurden 2,25mg Agarose in einem kleinen Meßkolben abgewogen. Im Anschluss wurde die Agarose durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle in 150ml 0,5% TAE-Puffer und 10ml Aqua bidest. gelöst. Die Agarose wurde kurz auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine Deformierung der Gelkammer zu vermeiden. Nach Zugabe von 1,5µl Ethidiumbromid zum Anfärben der cDNA- Fragmente und kurzem Durchmischen wurde die Agarose in die Horizontalgelkammer überführt. Die Ethidiumbromidkonzentration im Gel betrug 0,1 mg/ml. 10 ml Aliquot aus dem 2. MG-Zyklus bzw. GAPDH-Zyklus wurden mit 2 ml eines anfärbenden Gel-Ladepuffers auf einer Mikrotiterplatte gut durchmischt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Im Anschluss wurde die Spannung angelegt und die Elektrophorese gestartet. Bei dem großen Elektrophoreseschlitten betrug die Laufzeit 1 Stunde, eine Spannung von 200 V wurde angelegt, bei dem kleinen Gel 1 1/2 Stunden bei 100 V.

#### Zusammensetzung des 1,5% Agarosegels

2,25mg	Agarose
150ml	TAE-Puff
10ml	Aqua bidest.

### 3.10. Wachstumsfaktoren

#### 3.10.1 Stimulationsversuche:

Für die Stimulationsversuche wurden  $2 \times 10^7$  Zellen der jeweiligen Zellreihen, sowie Knochenmark, peripheres Blut und Leukapheresen von Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Grunderkrankungen wie AML, CML, NHL und gesunden Probanden eingesetzt. Diesen Zellen wurden die unten aufgeführten Zytokine zugesetzt. Im Anschluss wurden die Proben für 7 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. In dieser Zeit wurden die Proben 1-2 mal mit einem mit dem entsprechenden Zytokin versetzten Medium gefüttert. Zusätzlich wurde mit Beginn der Kultivierung eine Kontrollprobe ohne Zytokinzugabe angelegt. Nach Ablauf der 7 Tage wurden die Zellen abgeerntet, gewaschen und entweder direkt der RNA-Extraktion zugeführt oder bei -80°C eingefroren.

#### Wachstumsfaktoren:

-rHu flt3-Ligand, 10µg ;

-rHu IL-6, 25µg ;

-rHu TPO, 5µg ;

Die 3 Zytokine wurden bezogen von der Firma Promo Cell, Heidelberg, Deutschland

-rHu IL-3

-rHu SCF ;

Die beiden Wachstumsfaktoren wurden bezogen von der Firma Strahtmann Biotech, Hannover, Deutschland

-r G-CSF ;

-r GM-CSF ;

-rHU-II-1β, 5µg

Die 3 Wachstumsfaktoren wurden bezogen von der Firma R&D Systems

-γINF

Die bei der Stimulation eingesetzten Zytokine und deren Konzentration sind in der aufgeführten Tabelle dargestellt.

Tabelle 4

Zytokine	Arbeitskonzentration
GM-CSF	500 U/ml
SCF	5 U/ml
G-CSF	500 U/ml
IL-3	20 U/ml
IL-6	10000 U/ml
γINF	50 U/ml
IL-1β	1000 U/ml
Flt-3 Ligand	0,2 U/ml
TPO	1 U/ml

### ***3.10.2. Vorkommen und Funktion der verschiedenen Wachstumsfaktoren:***

#### G-CSF:

Exprimiert in Makrophagen, Stromazellen.

Funktion: Induziert die Funktion und die Differenzierung der neutrophilen Granulozyten und wirkt auch auf die hämopoetischen Vorläuferzellen.

#### GM-CSF:

Exprimiert in T-Zellen, Stromazellen

Funktion: Induziert die Proliferation der neutro-, eosino- und basophilen Granulozyten und Monozyten sowie der hämatopoetischen Vorläuferzellen; fördert die Funktion der reifen Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen.

#### SCF:

Fördert die Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen, induziert die Differenzierung und Funktion der Gewebemastzellen.

#### TPO:

Exprimiert in der Leber

Funktion: Fördert Megakaryo- bzw. Thrombopoese.

#### IL-1 $\beta$ :

Exprimiert in Makrophagen

Funktion: CSF-Kofaktor, induziert CSF- Produktion in Stromazellen, fördert T-Zell-Proliferation, induziert die Produktion von Akute-Phase-Proteinen.

#### IL-3:

Exprimiert in T-Zellen, Mastzellen

Funktion: G-CSF, induziert das Wachstum von myeloischen Zellen und die Differenzierung der basophilen und eosinophilen Granulozyten; stimuliert die basophilen und eosinophilen Granulozyten.

#### IL-6:

Exprimiert in Makrophagen, Stromazellen

Funktion: G-CSF-Kofaktor, induziert Akute-Phase-Protein-Synthese (Endogenes Pyrogen, Induktion von Fieber, Gewichtsverlust, Endothelzellaktivierung, Thrombozytose), fördert B-Zell- und Megakaryozyten- Differenzierung. (Regulation der Lymphopoese). Die stimulierende Wirkung ist direktvermittelt (Rezeptoren) oder parakrin über die Induktion der Zytokinproduktion in bestimmten Stromazellen.

#### Flt-3-Ligand:

Exprimiert in multiplen Organen

Funktion: Fördert die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen.

#### IFN- $\gamma$ :

Exprimiert in T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen

Funktion: Hemmt die Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen (Negativregulatoren der Hämpoese), antiviral; reguliert T-Zellen- und B-Zellen sowie NK-Zellfunktionen. Allerdings ist der parakrine Effekt oft mit einer wachstumsfördernden Wirkung auf die hämopoetischen Vorläuferzellen assoziiert.

### 3.10.3. Ansatz der Wachstumsfaktoren

#### GM-CSF:

Menge 236µg ; gewünscht 500U/ml  
 →  $33,6 \times 10^6 \text{U} / 236\mu\text{g}$  in 1ml ddH<sub>2</sub>O auflösen

#### G-CSF:

Menge 500.000U/ml ; gewünscht 500U/ml  
 → 500.00U/ml, Verdünnung 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O

#### SCF:

Menge 10µg ; gewünscht 5U/ml  
 → 10µg, 1:10<sup>3</sup> Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O

#### rHUTPO:

Menge 10µg ; gewünscht 1 ng/ml  
 → 10µg, Verdünnung 1:10<sup>4</sup> mit PBS und ddH<sub>2</sub>O

#### rHU flt3-Ligand:

Menge 10µg ; gewünscht 1ng/ml  
 → 10µg, Verdünnung 1:10<sup>5</sup> mit RPMI-Medium

#### IL-3:

Menge 10µg ; gewünscht 20U/ml  
 → 10µg, Verdünnung 1:175 mit Medium

#### IL-6:

Menge 25µg ; gewünscht 10<sup>4</sup>U/ml  
 → 25µg, Verdünnung 1:750 mit ddH<sub>2</sub>O

#### IL-1β:

Menge 10µg ; gewünscht 5ng/ml  
 → 10µg, 1:2x10<sup>4</sup> Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O

### 3.10.4. Interaktionen

Die relevante Produktion und Expression der Zytokine bleibt auf bestimmte Organe und Gewebe (Stromazellen bei der Produktion von SCF) beschränkt, im Serum sind sie kaum nachweisbar, weisen aber bereits in sehr geringer Menge eine biologische Wirkung auf. Als wichtige Induktoren einer Zytokinproduktion in Makrophagen oder T-Zellen gelten Pyrogene. Die Wirkung der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren erfolgt über Rezeptoren, die aus spezifischen und semispezifischen Ketten (bei der Hämopoetinsuperfamilie) bestehen. So erklärt sich, dass unterschiedliche Zytokinrezeptoren auf der gleichen Zelle gebildet werden können und sich damit ein erweitertes Wirkspektrum bzw. synergistische oder antagonistische Effekte ergeben. Allerdings werden durch die Zytokine nicht nur hämopoetische Vorläuferzellen und deren Differenzierung beeinflusst, sondern auch die reifen Zellarten durch konstante Expression von Zytokinrezeptoren. Viele Zytokinrezeptoren existieren so-wohl in gebundener als auch in freier Form und können auf diesem Wege biologische Wirkungen auslösen. Durch Bindung der Zytokine an den Rezeptoren können diese neu-tralisiert werden und in ihrer Wirkung aufgehoben werden.

Im Hinblick auf **Tumorerkrankungen** kommt es oft zu einer Deregulation der Zytokingene (z.T. sehr enge chromosomale Lokalisation bestimmter Zytokingene). Dies führt zu einer Überexpression von bestimmten Zytokinen bzw. Zytokinrezeptoren. In der Folge wirken diese Zytokine als Wachstumsfaktoren auf Tumorzellen. Bei der AML konnte dieses Phänomen für GM-CSF und IL-6 nachgewiesen werden.

Die Interferone, in diesem Fall IFN- $\gamma$ , gelten als Negativregulatoren. IFN- $\gamma$  wird von T-Lymphozyten nach Antigenstimulation gebildet.

### 3.11. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die Proben wurden so auf dem Agarosegel aufgetragen, dass in die rechten Fächer die Kontrollproben mit GAPDH und in die linken Fächer die Mammaglobinproben aufgetragen wurden. Flankiert an beiden Seiten bzw. in der Mitte des Gels getrennt durch einen Marker.

Im einzelnen sah die Verteilung wie folgt aus: (von rechts nach links beschrieben) zunächst der Marker, dann die Proben (die Verdünnungsreihen in aufsteigender Verdünnung), zum Abschluss der Reihe MAD/MB als Positivkontrolle und H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle.

Die Resultat wurde auf dem Gel durch das zugesetzte Ethidiumbromid sichtbar gemacht, im Anschluss fotografiert und das Bild elektronisch gespeichert.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte visuell durch Abbildung unterschiedlicher Gele der Verdünnungsreihen bzw. Patientenproben. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Absolut- oder Prozentwerten tabellarisch. Ein statistischer Vergleich bestimmter Analysen erfolgte mittels t-Test.

## 4. Ergebnisse

Zur Anwendung der MG- RT-PCR auf die Zellkulturen und Patientenproben mußten erst die optimalen Reaktionsbedingungen bestimmt und etabliert werden.

### 4.1. Optimierung der PCR-Bedingungen

Bereits im Kapitel Material und Methoden wurden die Grundlagen der Polymerasenkettenreaktion beschrieben. Im weiteren werden nun die einzelnen Reaktionsschritte erläutert, sowie die optimalen Bedingungen für die Mammaglobin-RT-PCR festgelegt.

Vor jedem wiederholten Thermozyklus steht das **Initiale Denaturieren** für einige Minuten, hierbei entstehen aus den Doppelstränge Einzelstränge.

Die 3 wichtigsten 3 Reaktionsschritte des sich wiederholenden Thermozyklus setzten sich wie folgt zusammen; zunächst die **Denaturierung**, die bei 94°C das Temperaturoptimum hat. Dabei werden die zu amplifizierende Fragmente denaturiert, da die DNA-Replikation nur an der einzelsträngigen Matritze beginnen kann. Im Anschluss folgt die Primerhybridisierung, **Annealing** genannt. Die eingesetzten Primer binden als komplementäre Oligonukleotide an bestimmte Sequenzen der DNA-Abschnitte auf den Einzelstränge. Dabei müssen die 20-30 Basensequenzen rechts und links des zu replizierenden Abschnitts bekannt sein. Die optimale Temperatur liegt ca. 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer.

Mit folgender Formel (Formel 1) kann die Annealingtemperatur  $T_m$  näherungsweise bestimmt werden :  $T_m \text{ in } ^\circ\text{C} = 4 \times (\text{Anzahl von C+G}) + 2 \times (\text{Anzahl von A + T})$

Im weiteren Verlauf wird der Ansatz auf 72°C erhitzt, der optimalen Reaktionstemperatur für die thermostabile Taq-Polymerase. Dieser Schritt wird als **Extension** bezeichnet, da die Primer durch die Polymerase verlängert werden. Durch vielfaches Wiederholen dieses Reaktionsschrittes wächst die Zahl der DNA-Kopien exponentiell. Nach 20 Zyklen sind mehr als Tausend Kopien entstanden.

Diese 3 Reaktionsschritte sollten eine bestimmte Anzahl von **Zyklen** wiederholt werden; < 10 template-Sequenzen können in <40 Zyklen so amplifiziert werden, dass sie hinterher im Ethidiumbromidgel sichtbar sind. An die letzte Extension schließt sich die **Finale Extension** an. Diese ermöglicht die Auspolymerisation und die Re-Naturierung der Einzelstränge zum Doppelstrang.

#### Optimierung der Bedingungen des PCR-Zyklus:

Zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurden eine Variation verschiedener Parameter wie der Annealing- Temperatur, der Primerlänge, sowie der Zahl der Thermozyklen insgesamt vorgenommen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5

Parameter	Variationsbreite
Annealing-Temperatur	58°C-62°C
Zyklus-Dauer	Denature 15 sec- 1min Annealing 15 sec- 1min Extension 20 sec- 1min
Häufigkeit der Zyklen	34, 35 ,40
Länge der Primer	18-29 Nukleotide

## 1. Annealing-Temperatur:

Nach Formel 1 berechnet, ergab sich für die 4 Mammaglobinprimer eine Schmelztemperatur zwischen 80°C und 84°C. Die optimale Temperatur liegt meist 3°-5°C unterhalb des errechneten Wertes liegt, also bei ungefähr 75°C. Es wurde allerdings aus den vorliegenden Protokollen eine Temperatur von 62°C gewählt, da zu hohe Temperatur das Annealing verhindern (Shipman). Nach der Angabe der Herstellerfirma Pharmacia liegen die optimalen Temperaturen im Mittel bei 74°C. Temperaturen niedriger als 62°C, wie in den Versuchen die eingesetzten 58°C, führten zur Amplifikation von vorwiegend genomischer DNA, 2814bp groß. Im Bereich des Mammaglobingens liegen 2 Introns, die bei der Amplifikation nicht abgespalten wurden und so zu einem weitaus größerem Endprodukt führten als Mammaglobin mit 210bp. So zeichnete sich neben den Banden im Bereich von Mammaglobin auch die oben beschriebenen weitaus größeren Produkte signalintensiv im Agarosegel ab.

## 2. Anzahl der Thermozyklen

Ein weiterer wichtiger Parameter war die Anzahl der Thermozyklen. Begonnen wurde mit 34 wie im vorliegenden Zach-Protokoll beschrieben. Hierbei zeigten sich eine Amplifikation von vorwiegend unspezifischen Banden und z.T. von Banden im Bereich von Mammaglobin. Erst mit einer Erhöhung der Zyklusanzahl auf 40 entstanden deutliche Banden im Bereich von 500 Basenpaaren (also im Bereich, wo Mammaglobin zu erwarten war). Außerdem ließ sich erst mit steigender Anzahl an Thermozyklen eine Sensitivität von  $10^{-4}$  in den Verdünnungsreihen erzielen.

## 3. Primerlänge

Eine Primerlänge zwischen 24 und 29 Nukleotiden erbrachte im Vergleich zu den kürzeren Primern mit im Durchschnitt nur 18 Nukleotiden, die erwünschten Banden im Bereich von 500 Basenpaaren. Bei den kürzeren Primern zeigte sich bei Auswertung der Elektrophorese, dass vor allem genomische DNA amplifiziert worden war.

## 4. Unterschiedliche Temperaturzyklen:

1. Zyklus nach dem Zach-Protokoll:

2 min 95°C, 35 x (15sec 95°C, 15 sec 62°C, 20 sec 72°C), 7 min 72°C

2. Erweiterter Zyklus:

4 min 94°C, 34 x (1min 94°C, 1 min 62°C, 20 sec 72°C), 7 min 72°C

4 min 94°C, 34 x (1min 94°C, 1 min 62°C, 1 min 72°C), 11 min 72°C

3. Änderung der Annealing-Temperatur:

4 min 94°C, 34 x (1min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C), 11 min 72°C

4. Endgültiger Zyklus:

4 min 94°C, 40 x (1min 94°C, 1 min 62°C, 1min 72°C), 11 min 72°C

**Konstante Faktoren:**

Nach den vorliegenden Protokollen wurde versucht, die optimalen Menge bzw. Konzentration der verschiedenen Reaktionspartner einzusetzen. Mit 25pmol pro Primer pro 50µl PCR-Ansatz wurde eine konstante Primerendkonzentration angestrebt.

Die in den beiden PCR-Zyklen eingesetzten DNA-Menge mit 4µl cDNA im ersten PCR-Zyklus und 2µl cDNA im zweiten PCR-Zyklus, sowie GAPDH mit 7,5µl im ersten PCR-Zyklus blieben unverändert. Die Taq-Polymerase wurde mit einer optimalen Konzentration von 0,5U/50µl zugefügt. Eine zu hohe Enzymkonzentration könnte zu einer abnehmenden Spezifität führen. In dem eingesetzten PCR-Kit war unter anderem MgCl<sub>2</sub> mit einer Konzentration von 2,0 mM enthalten. Dieses wurde dem Reaktionsgemisch zugesetzt, um die Enzymaktivität zu beeinflussen und zur Komplexbildung mit dNTP zu führen. Diese werden von der Polymerase erkannt. Eine einheitliche dNTP Mixture wurde gewählt, d.h. es wurden von dATP, dCTP, dGTP und dTTP jeweils 2 µl eingesetzt.

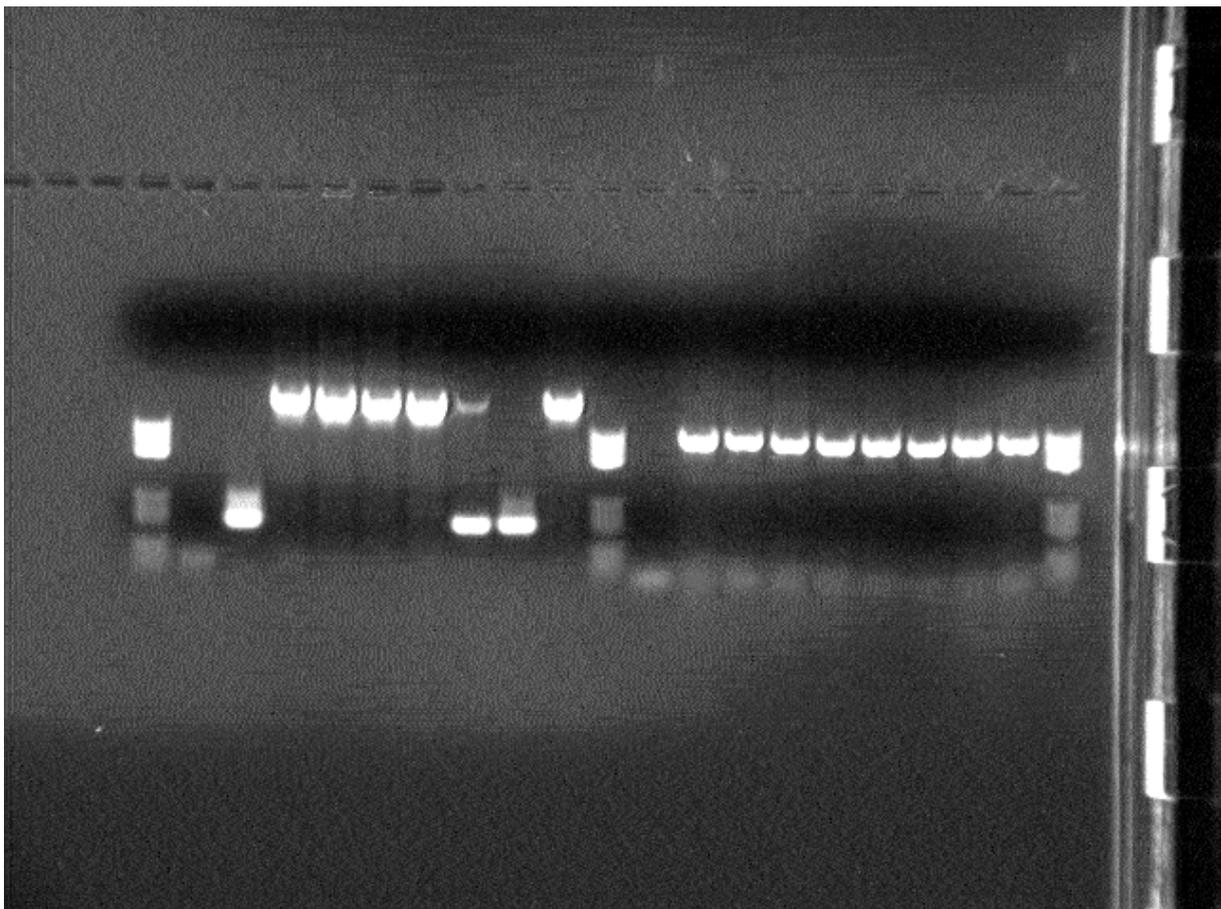


Abbildung 1, MDA/MB-Verdünnungsreihe

Im dargestellten Gel einer MDA/MB-Verdünnungsreihe kommen sehr gut die oben beschriebenen unspezifischen Banden zum Ausdruck. Links aufgetragen im Gel stellt sich die MDA/MB-Verdünnungsreihe dar, rechts die Kontrolle mit GAPDH. Wie sich anhand der Marker ablesen ließ, zeichneten sich im Bereich von ungefähr 1200 Basenpaaren scharfe Banden ab. Zusätzlich allerdings nur bis zu einer Verdünnung von  $10^{-2}$  im Bereich von Mammaglobin.

Die Verdünnungsreihe wurde mit kurzen Primern, einer Annealingtemperatur von 58°C und im erweiterten Temperaturzyklus, wie oben angegeben, hergestellt.

#### 4.2. Verdünnungsreihen von MDFA/MB und MCF-7:

Zur Kalibrierung der MG-RT-PCR wurden insgesamt 18 Verdünnungsreihen mit den Zellreihen MCF-7 und MDA/MB untersucht.

Da sich die initialen Ergebnisse mit MDA/MB erfolgreicher erwiesen als mit MCF-7 (es ließ sich nur eine Sensitivität von  $10^{-3}$  erreichen), wurden die Untersuchungen mit MDA/MB fortgesetzt. Es wurden 15 MDA/MB-Verdünnungsreihen untersucht. Die MDA/MB –cDNA-Sequenz wurde bei 6 Proben (40%) mit einer Sensitivität von  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  nachgewiesen. Ein 2.Gipfel fand sich bei 4 Proben (27%) mit einer Sensitivität  $10^{-6}$

Tabelle 6, Verdünnungsreihen mit MDA/MB und MCF-7

Verdünnungsstufe	MCF-7	MDA/MB	Insgesamt
$10^{-2}$	2 Proben	1 Probe	3 Proben
$10^{-3}$	1 Probe	5 Proben	6 Proben
$10^{-4}$	0	2 Proben	2 Proben
$10^{-5}$	0	1 Probe	1 Proben
$10^{-6}$	0	4 Proben	4 Proben
$10^{-7}$	0	2 Proben	2 Proben
Insgesamt	3 Proben	15 Proben	18 Proben

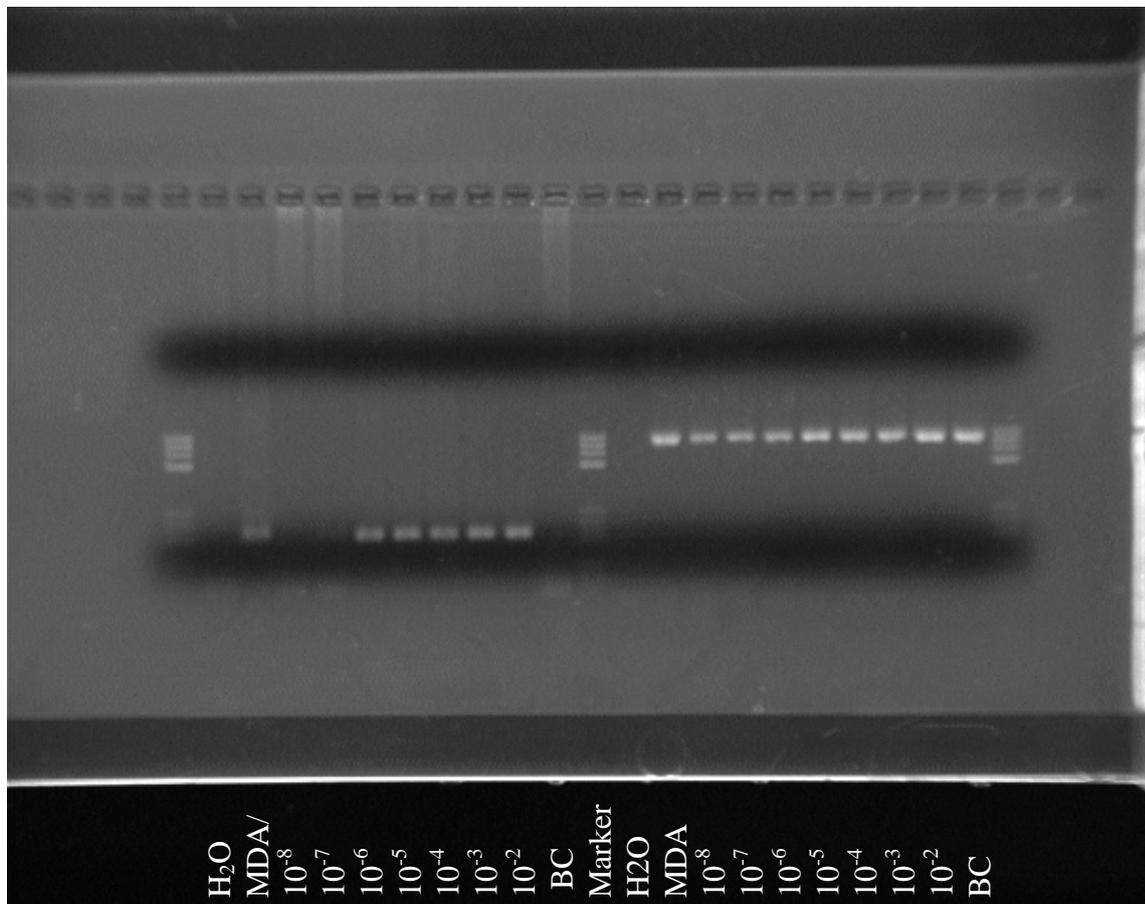


Abbildung 2, DNA-Gel der MDA/MB-Verdünnungsreihe

### 4.3. Ergebnisse der MG-RT-PCR angewandt auf Mammakarziomproben

Zur Validierung der Möglichkeit der Anwendung der Methode in der klinischen Diagnostik wurden insgesamt 80 Proben von Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht. Das Material der Proben stammte aus Leukapheresen, Knochenmark und peripherem Blut. Zusätzlich war bekannt, in welchem Stadium der Tumorerkrankung sich die Patientin befand. Die Proben wurden eingeteilt in Stadium II, Stadium III und dem metastasiertem Stadium, sowie Proben mit der Diagnose des inflammatorischem Mammakarzinoms. Diese Stadien konnten in das Ergebnis einer positiven MG-RT-PCR miteinbezogen werden. Es wurde versucht eine relativ gleichmäßige Aufteilung der 3 Probengruppen zu erzielen.

Die untersuchten Proben zeigten folgende prozentuale Verteilung, 33% der Proben waren stammten aus Knochenmark, davon mit 59% der größte Teil von Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus. 40% der Proben stammten aus Leukapheresen, davon mit 41% ebenfalls die Mehrheit von Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus. Die restlichen 26% der Proben aus peripherem Blut, mit 66% der überwiegende Anteil von Patientinnen mit nodal-positiven Mammakarzinom.

Insgesamt 33% der Proben hatten einen positiven Nachweis für Mammglobin in der RT-PCR. Davon auf die einzelnen Untergruppen bezogen zeigte sich folgende Häufigkeitsverteilung dar: 31% Leukaphereseproben , 30% Knochenmarksproben und 38% Proben aus peripherem Blut. Somit stellt es sich eine homogene Aufteilung dar. In den einzelnen Untergruppen zeigten wie erwartet die metastasierten Stadien bzw. die nodal- positiven Tumorstadien den prozentual größten Anteil an positiven Resultaten. Bei Proben aus peripheren Blut mit metastasiertem Tumorstadium ergaben 100 % der Proben ein positives Resultat, bei allerdings geringen Probenzahl. Die Vergleichsgruppe aus Knochenmark zeigte 50% positive und 50% negative Resultate mit vergleichbar geringer Probenzahl. Im Stadium des inflammatorischen Mammakarzinoms, klinisch mit der schlechtesten Prognose verbunden, stellten sich in 2 Untergruppen 100% negative Resultate dar.

Tabelle 7

Material	Probenanzahl		positiv für MG-RT-PCR		negativ für MG-RT-PCR	
<b>Knochenmark</b>	27 von 80	33%	8 von 27	30%	19 von 27	70%
nodal positiv	16	59%	<b>5</b>	<b>32%</b>	11	68%
keine	6	22%	1	17%	5	83%
metastasiert	4	15%	2	<b>50%</b>	2	50%
inflammatorisch	1	4%	0	-	1	100%
<b>Leukapherese</b>	32 von 80	40%	10 von 32	31%	22 von 32	69%
nodal positiv	13	41%	3	23%	10	77%
keine	3	9%	1	33%	2	67%
metastasiert	11	34%	<b>5</b>	<b>45%</b>	6	55%
inflammatorisch	5	16%	1	20%	4	80%
<b>Peripheres Blut</b>	21 von 80	26%	8 von 21	38%	13 von 21	62%
nodal positiv	14	66%	<b>4</b>	<b>29%</b>	10	71%
keine	2	10%	1	50%	1	50%
metastasiert	3	14%	3	<b>100%</b>	0	-
inflammatorisch	2	10%	0	-	2	100%

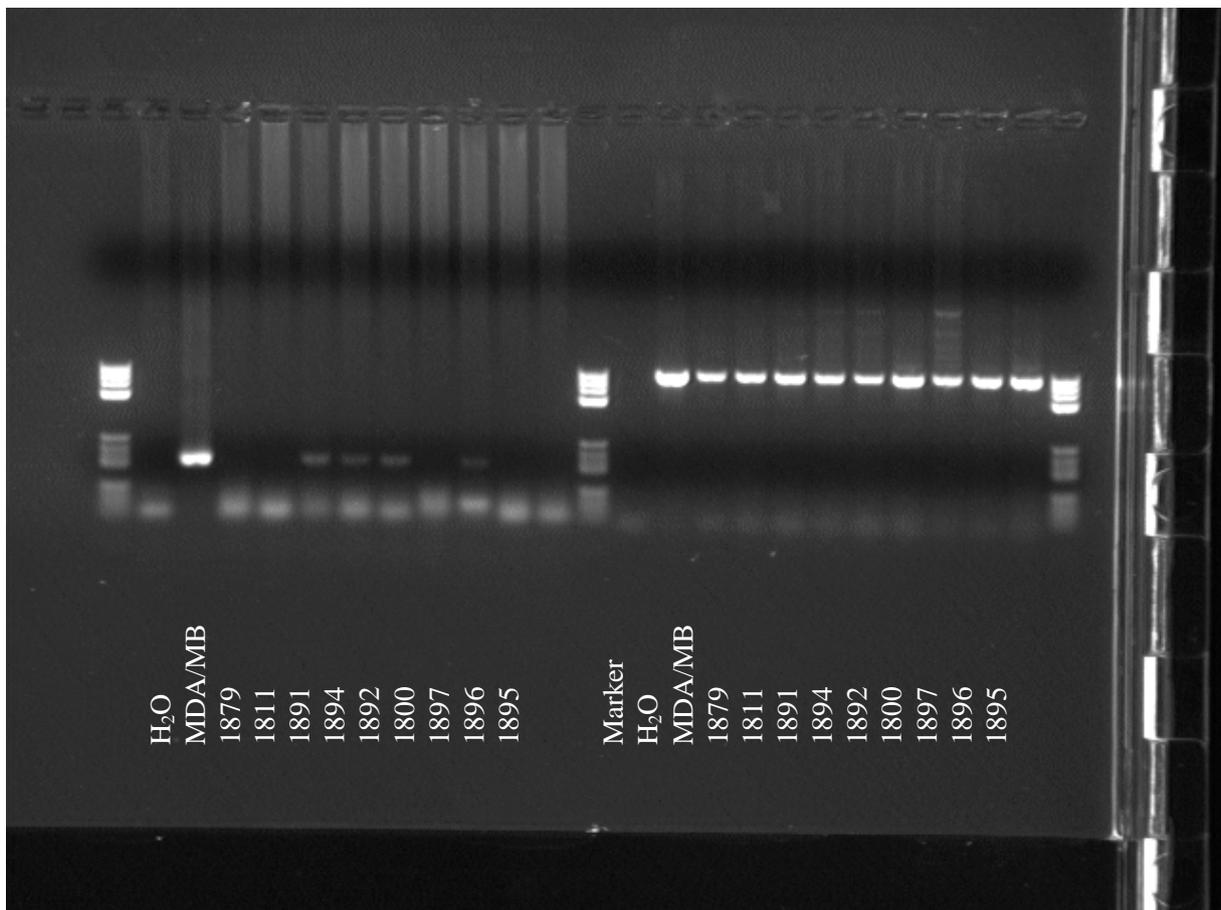


Abbildung 3  
DNA-Gel der MG-RT-PCR angewandt auf verschiedene Mammakarzinom-Proben (siehe Nummerierungen)

#### 4.4. Negativkontrollen:

Negativkontrollen von 51 Spendern, die nicht an einem Mammakarzinom erkrankt waren, wurden untersucht, um die Mammaglobin-RT-PCR auf ihre Spezifität zu überprüfen. Die Proben stammten in 35% der Fälle von Patienten mit einer AML, in 16% von gesunden Spendern und in 16% von Patienten mit einer CML. Die verbliebenen 33 % stammten von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen wie NHL, Plasmozytom oder Weichteilsarkomen. Die Mammaglobin-Sequenz konnte aus 1,7% der Negativkontrolle amplifiziert werden. Die Verteilung der falsch-positiven Ergebnisse unter den unterschiedlichen Spenderproben sowie Materialien fiel gleichmäßig aus ohne Bevorzugung einer bestimmten Gruppe. In Tabelle 6 sind die eingesetzten Untersuchungsmaterialien, in diesem Fall Proben aus Knochenmark, peripherem Blut und Leukapheresen, aufgeführt. Sowie die Verteilung der nachgewiesenen Mammaglobin-Sequenzen innerhalb der Proben in absoluten Zahlen nach Durchführung der MG-RT-PCR.

Tabelle 8

	Peripheres Blut	Leukapherese	Knochenmark	Insgesamt
MG-positiv	0	2	4	6
MG-negativ	9	15	21	45
Insgesamt	9	17	25	51
Falsch positiv	0	2	4	6

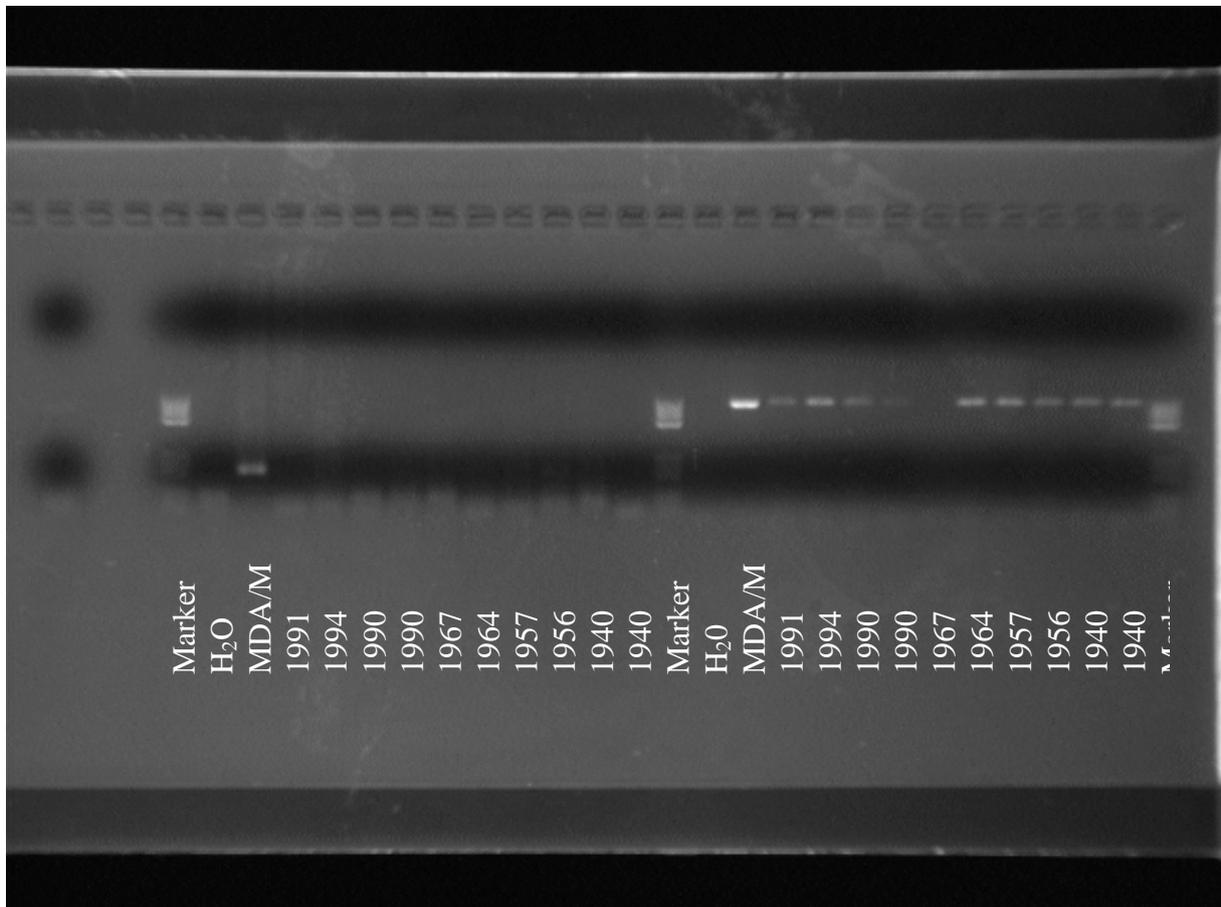


Abbildung 4, DNA-Gel nach MG-RT-PCR der Negativkontrollen

#### 4.5. MG-RT-PCR angewandt auf die Tumorzellen:

Es wurden 5 Tumorzellreihen (U-937, Raji, HbMec, K562 und TF-1) von den insgesamt 8 eingesetzten Tumorzellreihen vor den Stimulationsversuchen untersucht. Dieses sollte als Ausgangsergebnis vor der Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren dienen. Wie in der unten abgebildeten Tabelle 9 dargestellt, konnte nur bei einer der beiden U-937-Zelllinien ein positiver Nachweis der Mammaglobin-Sequenz dargestellt werden. Die zweite U-937 Probe blieb negativ, sowie die übrigen Proben der anderen 4 Zelllinien. Aus diesen Ergebnissen kann folgende Schlussfolgerung gezogen werden, dass bei den Zellreihen TF-1, Raji, K562 und HbMec die positiven Resultate der MG-RT-PCR nach Stimulation auf diese zurückgeführt werden kann. Bei der U-937 Zellreihe ist dieser Rückschluss nicht möglich, da bereits 50% der Proben vor Stimulation ein positives Resultat zeigten.

Tabelle 9

Tumorzellreihe	MG positiv	MG negativ
HbMEC	-	2
U-937	1	1
K562	-	2
TF-1	-	1
Raji	-	2

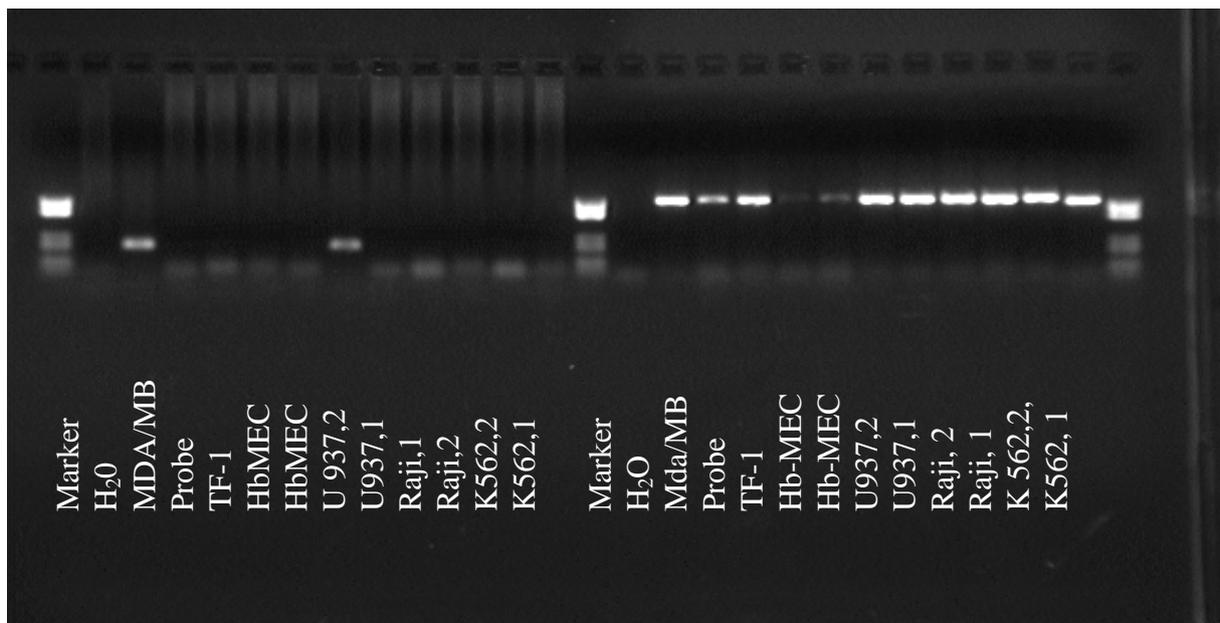


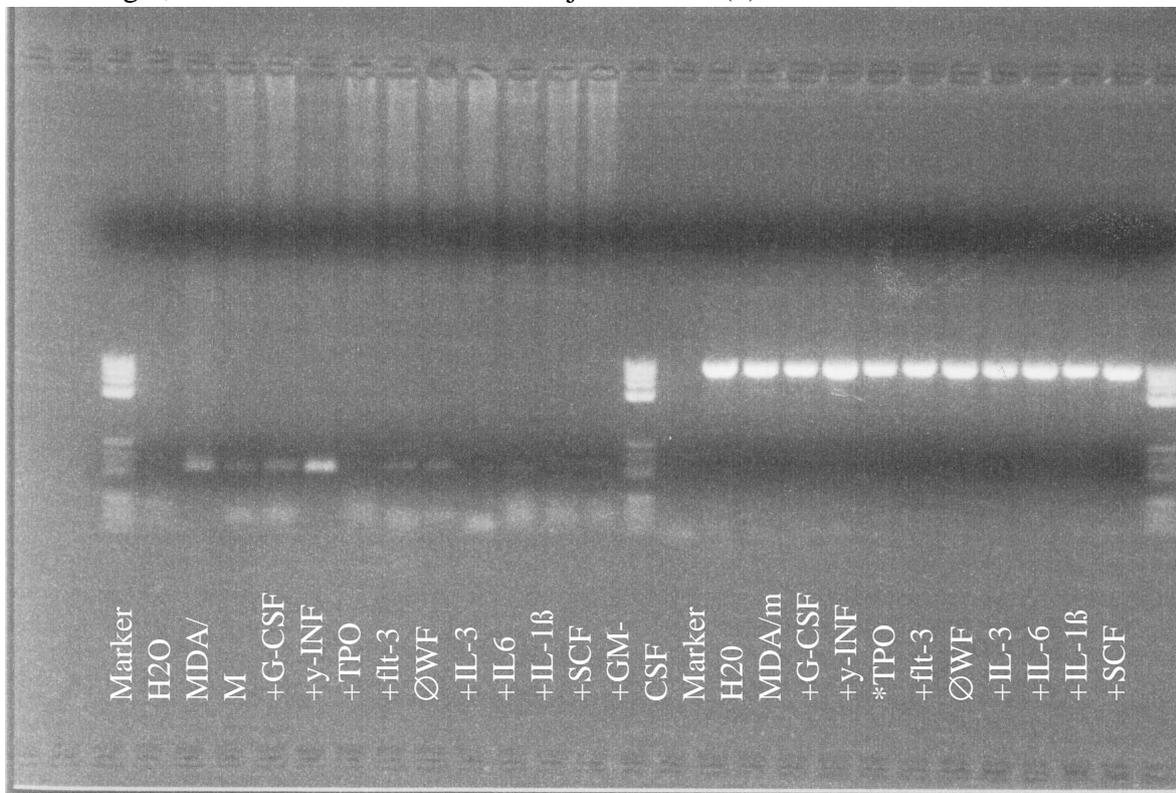
Abbildung 5, DNA-Gel der Tumorzellreihen TF-1, U-937, Raji 1 und 2, K 562 1 und 2, HbMec 1 und 2

#### 4.6. Stimulationsversuche mit den Zellreihen (Raji)

Es wurden 6 unterschiedliche Zellreihen (K562, HL-60, U-937, TF-1, Raji und Fibroblasten) über 7 Tage mit folgenden Wachstumsfaktoren: IL-3, IL-6, TPO, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, G-CSF, SCF, flt3 und  $\gamma$ -INF stimuliert, um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die MG-RT-PCR abschätzen zu können. Im Anschluss wurden die Proben der MG-RT-PCR unterzogen. Die Ergebnisse wurden im Anschluss auf dem Ethidiumbromid- Gel sichtbar gemacht.

Insgesamt wurden 14 Stimulationsreihen durchgeführt (HL-60 und K562 jeweils 3mal, die übrigen Proben 2mal). Als Negativkontrolle diente eine Probe vor Stimulation und eine Probe nach 7 Tagen, die unter gleichen Bedingungen wie die übrigen Proben angelegt wurden, nur ohne Zusatz von Zytokinen. Die Resultate der Stimulationsversuche sind in Tabelle 8 schematisch aufgeführt. Mit 78% fanden sich die meisten positiven Ergebnisse bei der Stimulation mit GM-CSF in den unterschiedlichen Zellreihen. Am niedrigsten fielen die Resultate bei Stimulation der Zellreihen mit IL-3 aus. Zusätzlich bemerkenswert ist, dass bereits Zellreihen wie die Fibroblasten am Tag 0 und ohne Interleukinzusatz einen positiven Nachweis in der MG-RT-PCR zeigten. Raji, initial mit einem negativen MG-RT-PCR Ergebnis, erbrachte in 94% der Fälle ein positives Ergebnis (Ausnahme Stimulation mit flt3). Weniger eindeutig waren die Resultate nach Stimulation der HL-60 Zellreihe, in nur 30% lag ein positives Ergebnis vor.

Abbildung 6, DNA- Gel der stimulierten Raji-Zellreihe (2)



#### 4.7. Stimulationsversuche mit Patientenproben (AML)

##### Tabelle zur Auswertung der Stimulation durch Zytokine von den Zellreihen und den Patientenproben, Durchführung T-Test

Es wurden insgesamt 21 Patientenproben den Stimulationsversuchen unterzogen, 29 % davon stammten von gesunden Spendern, 19% von Patienten mit einer AML, jeweils 14 % von Patienten mit einem Plasmozytom oder einem Sarkom, die übrigen 24 % von Patienten mit unterschiedlichen Malignomen. Diese Proben wurden der Stimulation mit den Zytokinen IL-3, IL-6,  $\gamma$ -INF, GM-CSF, G-CSF, SCF, IL-1 $\beta$ , TPO und flt-3 unterzogen.

Die Stimulation der Proben und die Durchführung und der Mammaglobin -RT-PCR erfolgte erst wenn  $2 \times 10^7$  Zellen /ml zur Verfügung standen, so dass die Verteilung der Stimulationsversuche nicht gleichmäßig für alle Zytokine und Proben ausfiel. Ferner ist anzumerken, dass die Ergebnisse weniger eindrücklich sich darstellten als bei den vorab stimulierten Tumorzelllinien. Verglichen mit den im Vorfeld stimulierten Tumorzellreihen, die nach Stimulation mit GM-CSF in 78% der Fälle positive Resultate erbrachten, zeigten sich bei den Patientenproben nur in 30% der Fälle positive Resultate. Diese zeigten sich am häufigsten nach Stimulation mit den Zytokinen IL-3 und  $\gamma$ -INF (mit 29% bzw. 30% positiven Resultaten). Bezogen auf die Patientenproben fanden sich die häufigsten positiven Ergebnisse nach Stimulation in der Gruppe der gesunden Spender (außer bei Stimulation mit SCF und IL-6 ergaben sich positive MG-RT-PCR Ergebnisse); sowie bei Proben von Patienten mit AML (außer bei Stimulation mit SCF und flt-3 positive MG-RT-PCR Resultate).

Die Plasmozytom- Proben zeigten in keiner der Stimulationsversuche ein positives Ergebnis. Das Abbildung zeigt beispielhaft eine Patientenprobe (AML) nach Stimulation durch unterschiedliche Zytokine.

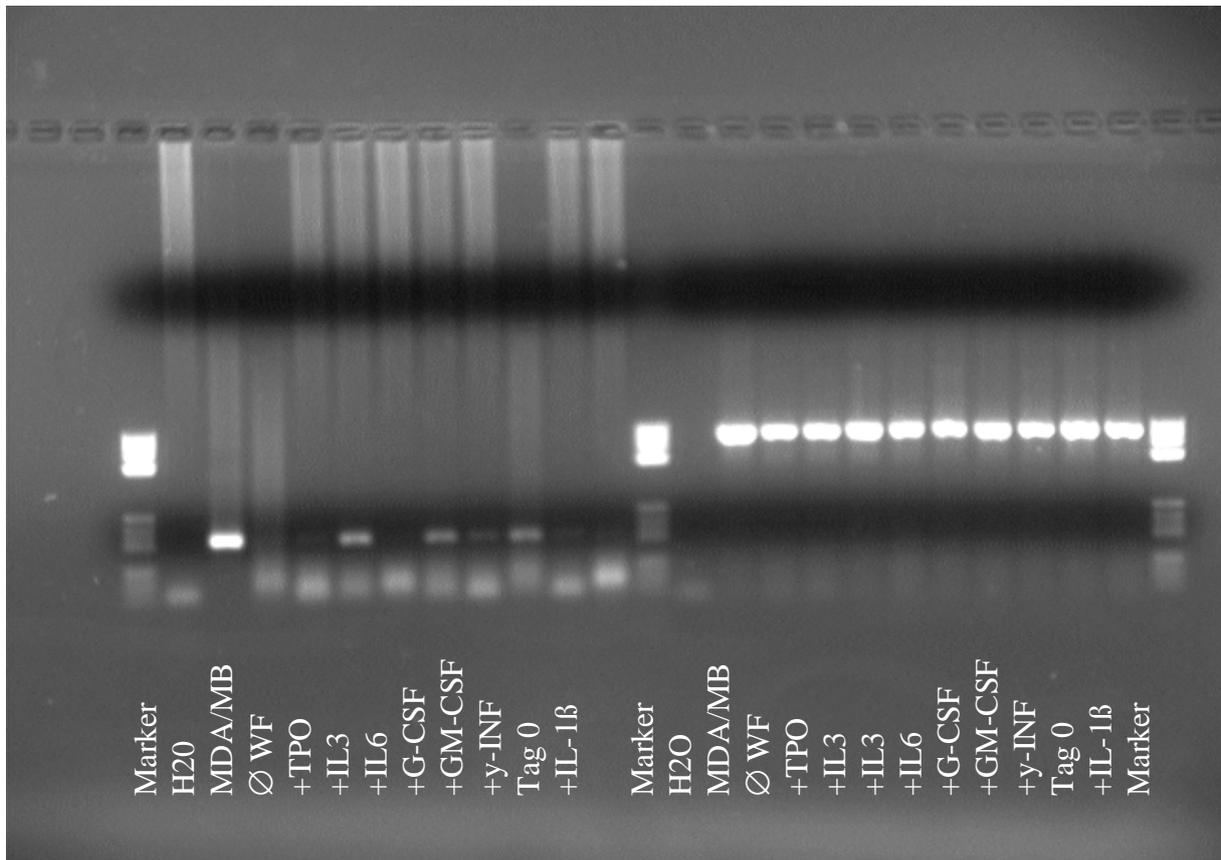


Abbildung 7, DNA-Gel des Stimulationsversuchs der Leukapherese der Patientenprobe 1966 (AML)

Zelllinien	Ohne WF		IL3		IL6		IL-1β		SCF		INFy		FLT3		TPO		G-CSF		GM-CSF	
	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
MG	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
Fibroblast.	0	3	0	3	0	3	2	1	1	2	0	3	2	1	1	2	0	3	2	1
HL60	1	4	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1
K562	0	2	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	1	1	2	0	2	0	2	0
Raji	1	1	1	1	2	0	1	1	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
TF1	1	1	1	1	1	1	2	0	1	1	0	2	2	0	2	0	2	0	2	1
U937	1	1	1	1	1	1	2	0	1	1	0	2	2	0	2	0	2	0	2	1
%	31	5	50	50	64	36	71	29	64	36	57	43	71	29	64	36	57	43	78	22
tTest			0,363		0,102		0,093		0,102		0,296		0,042		0,175		0,296		0,041	
Pat.-Proben	Ohne WF		IL3		IL6		IL-1β		SCF		INFy		FLT3		TPO		G-CSF		GM-CSF	
MG	0	6	3	3	0	3	2	3	0	4	1	2	2	4	1	4	1	2	2	2
Gesund	0	3	0	2	0	2	0	1	0	1	0	1	0	3	0	3	0	3	0	2
Plasmocyt.	0	6	1	3	1	5	1	3	0	2	1	2	0	5	2	3	1	3	2	2
AML,ALL	0	2	1	1	0	2	0	1	1	1	0	1	0	2	1	1	0	2	0	2
CML	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
NHL	0	3	0	2	0	2	0	3	0	2	1	1	0	3	0	3	0	3	0	3
Sarkome	0	100	29	71	5	95	21	69	8	92	30	70	10	90	26	74	13	87	25	75
tTest			0,141		0,363		0,203		0,363		0,076		0,363		0,042		0,175		0,175	

Tabelle 10

#### 4.8. Vergleich der Immunzytochemie und RT-PCR als Nachweismethoden:

Insgesamt wurden 66 Proben von Patientinnen mit Mammakarzinom in unterschiedlichen Tumorstadien, das Material stammte aus Knochenmark, peripheren Blut und Leukapheresen, mittels der CK20 RT-PCR, MG-RT-PCR und der Immunzytochemie untersucht.

Durch Gegenüberstellung der Resultate der verschiedenen Methoden sollte die Häufigkeit in der Übereinstimmung festgestellt werden. Mit 77% (d.h. 51 identische Ergebnisse von 66 untersuchten Proben) zeigten die CK20-RT-PCR und die Immunzytochemie die beste Übereinstimmung der Ergebnisse.

Die geringsten Übereinstimmungen fand sich bei einem Vergleich der Mammaglobin- RT-PCR und der Immunzytochemie mit 63% (42 der 66 Proben).

Die CK-20-RT-PCR im Vergleich zur MG-RT-PCR erbrachte übereinstimmende Resultate in 67% der Fälle. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Übereinstimmung in allen 3 Fällen bei mindestens 63% liegt.

		Immunzytochemie	
		positiv	negativ
CK20-RT-PCR	positiv	2	8
	negativ	6	49

Vergleich Immunzytochemie und CK20-RT-PCR

		Mammaglobin-RT-PCR	
		positiv	negativ
CK20-RT-PCR	positiv	3	5
	negativ	17	41

Vergleich Mammaglobin-RT-PCR und CK20-RT-PCR

		Immunzytochemie	
		positiv	negativ
Mammaglobin-RT-PCR	positiv	3	17
	negativ	7	39

Vergleich Mammaglobin-RT-PCR und Immunzytochemie

## **5. Diskussion**

In den letzten Jahren hat der Nachweis der sogenannten Minimal Disease bei Patientinnen mit Mammakarzinom an Bedeutung gewonnen. Die meisten Untersucher setzten die klassische Immunzytologie ein. Analog zum Nachweis des MRD bei hämatologischen Neoplasien wurden auch für das Mammakarzinom molekulargenetische Verfahren entwickelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die bereits von Zach et al. beschriebene Mammaglobin-PCR ausführlich evaluiert und sollte optimierte werden.

### **5.1. Diskussion der PCR-Materialien und Methoden:**

Für die Durchführung der PCR musste als erstes ein geeignetes Verfahren zur RNA-Extraktion gefunden werden. Ziel war es eine ausreichende Menge RNA mit hoher Reinheit sicherzustellen. Insgesamt wurden 3 unterschiedliche Extraktionskits untersucht, zunächst das Roti-Quick-Kit (Fa. Roth), das RNeasy Midi Kit (Fa. Quiagen) und zum Schluss das RNazol-Kit (Fa. WAK-Chemie). Die beiden zuerst aufgeführten Kits erbrachten zwar eine ausreichende Reinheit der RNA mit einer  $A_{260/280}$ -Ratio zwischen 1,5 und 2,0 in der durchgeführten UV-Spektrometrie. Allerdings zeigte die Elektrophorese für beide Kits keine oder unzureichende Banden. Daher wurden für die RNA-Extraktion das RNazol-Kit angewandt, denn es zeigte sich aus ausreichende Reinheit der RNA in der UV-Spektrometrie und in der Gel-Elektrophorese konnten reproduzierbare Banden für Mammaglobin bzw. GAPDH Zielsequenz erzielt werden. Zach setzte in seiner Studie das Kit TRIZOL reagent (Fa. Life Technologies) ein.

#### **5.1.1. Nested- PCR**

Bei der in den Untersuchungen ausgewählten PCR-Verfahren handelt es sich um eine nested-RT-PCR. In der Literatur wird diese Form der PCR als eine Technik angesehen, mit der sich allgemein eine sehr hohe Sensitivität erzielen lässt. Dabei wird im 1.PCR-Zyklus das gewünschte DNA-Fragment zunächst durch die beiden äußeren Primer abgelesen. In der 2.Runde der PCR erfolgt dann der Einsatz der nested-Primer, d.h. diese Primer setzen im internen Bereich des bereits im 1.PCR-Zyklus erhaltenen Produkts an. Im weiteren unten aufgeführt die Verteilung bei der Mammaglobin-PCR, im 1.PCR-Zyklus werden MG-1 und MG-2 eingesetzt, im 2.PCR-Zyklus dann die nested-Primer MG-3 und MG-4. Aus dieser Technik lässt sich leicht erschließen, dass hierbei eine direkte Kontrolle des im 1.PCR-Zyklus erhaltenen Fragments erfolgt. Allerdings besteht vor allem bei Einsatz als Routinemethode die Gefahr der Kontamination.

MG-1: (63-89)	Lokalisation (5'-3')
MG-2: (387-361)	Lokalisation (5'-3')
MG-3: (96-119)	Lokalisation (5'-3')
MG-4: (297-269)	Lokalisation (5'-3')

#### **5.1.2. Primer**

Für die Evaluation der Mammaglobin- RT-PCR wurden die in der Studie von Zach et al eingesetzten Primer ausgewählt. Die genaue Abfolge der Basensequenzen ist im Kapital Material und Methoden dargestellt. Bei der Auswahl der Primer spielten bestimmte Grundzüge im Design eine wichtige Rolle. So sollten die „3'-Enden“ der Primer nicht komplementär zueinander sein (alle Primer enden mit einer nicht einander entsprechenden Sequenzen). Die Verteilung von C+G, sowie A+T sollte ausgewogen sein, der Anteil an G+C

bei 40-75% liegen (Mammaglobin 1: G+C= 54%). T sollte nur vereinzelt auftauchen, C hingegen am besten aufeinander folgend (bei jeder der 4 Primer ist dieses der Fall). Außerdem sollten die eingesetzten Primer spezifisch sein für die ausgewählte Genregion. Allerdings sind die ausgewählten Mammaglobinprimer mit bis zu 27 bp pro Primer vergleichsweise länger als in der Standardliteratur empfohlen.

In den ersten Untersuchungen wurden Mammaglobinprimer von der Firma Gibco eingesetzt, mit 18 bis 20bp wesentlich kürzer als die von Zach ausgewählten. Begonnen wurde im 1.PCR-Zyklus mit OS (Outer-sense) und OA (Outer-antisense), im 2.PCR-Zyklus mit IS (Inner-sense) und IA (Inner-antisense). In den durchgeführten PCR-Zyklen zeigten die kurzen Primer von Gibco im Vergleich zu den längeren Primern eine ausgeprägt Expression von unspezifischer DNA, erreichten keine hohe Verdünnungsstufe und wurden somit nicht weiter eingesetzt.

Watson et al. haben in ihrer Studie kürzere Primer als Zach, im Mittel betrug die Länge der Primer 21 Basen, für ihre nested-PCR ausgewählt. Die Sequenzen der Primers sahen wie folgt aus: im ersten PCR-Zyklus MG-Forward-Reverse-Amplifikation Primer

5'-AGCACTGCTACGCAGGCTCT-3' und MG-Reverse-Amplifikation-Primer

5'-ATAAGAAAGAGAAAAGGTGTGG-3', im zweiten Zyklus

MG-Outer-Forward-Amplifikation-Primer 5'-CAGCGGCTTCCTTGATCCTTG-3' und

MG-Outer-Reverse-Amplifikation-Primer 5'-TAGCAGGTTTCAACAATTGTC-3'.

Die 3'-Enden weisen wie bei Zach keine Komplementarität auf; allerdings ist die Verteilung von G+C und A+T weniger ausgewogen, z.B. im Hinblick auf den MG-Reverse-Amplifikation-Primer. T erscheint mehrmals direkt hintereinander als Base. Zusammenfassend kommt Watson zu folgendem Ergebnis: Von den 15 Proben von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom zeigten 9 in der MG-RT-PCR positive Resultate; alle Negativkontrollen blieben negativ. Es steht noch ein direkter Vergleich unter den übereinstimmenden PCR-Bedingungen zwischen den Primern von Zach (37) und von Watson (36) aus.

### 5.1.3. Temperaturzyklus

Wie bereits im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, waren verschiedene Variationen im Temperaturzyklus zur Auswahl des optimalen Zyklus erforderlich. Zach et al wählten für die PCR-Zyklen insgesamt sehr kurzen Zeiten (Denaturierung 15 sec, Annealing 15 sec und Extension 15 sec mit insgesamt 30 Zyklen). Im Gegensatz zu den Angaben von Watson, der folgende Zeiteinteilung vorsah: Denaturierung 45 sec, Annealing 60 sec und Extension 45 sec mit insgesamt 40 Zyklen und als letztes der die in dieser Studie dargestellten Einteilungen.

Ebenso variierten die Annealingtemperaturen zwischen 55°C und 62°C. Die Annealingtemperatur, berechnet nach der Regel von Wallace (siehe 4.1. Ergebnisse), beschreibt die maximale Temperatur, bei welcher sich der Primer noch an den komplementären DNA-Strang bindet. Bei einer zu niedrigen Temperatur kann es zu lockeren und damit unspezifischen Bindung kommen, in der Folge zu unspezifischen Reaktionsprodukten. Wird die Temperatur erhöht, binden die Primer an den stabilen Bindungsstellen, an den unspezifischen Bindungsstellen kommt es zu einem Aufschmelzen der Verbindungen, da die Bindungsenergie zu niedrig ist. Ist die gewählte Temperatur zu hoch entsteht kein Produkt. Da man die Basenpaare kennt, kann man die Annealingtemperatur genau bestimmen, sie liegt meist ca. 3° unter Schmelztemperatur. Bei der eingestellten Temperatur kann es allerdings auch zur Renaturierung des ursprünglichen Doppelstrangs kommen, dieses wird durch Zugabe eines Primerüberschusses verhindert. (M. Kröger et al., 2006)

Grundsätzlich gelten 20-30 sec als ausreichend für die Denaturierung, allerdings sollte die Zeit an die Reaktionsgefäße, die Thermozykler, sowie die Länge der DNA-Fragmente

angepasst werden, so Rolfs (Rolfs et al,1992). Um ein zufriedenstellendes Ergebnis bei der Extension zu erreichen, werden 20 sec als ausreichend angesehen. Die Zahl der durchgeführten Temperaturzyklen sollte zwischen 25 und 35 liegen. Mehr als 40 Zyklen beinhalten das Risiko, dass die Primer bereits aufgebraucht sind, noch Reaktionsmaterialien verbleiben und so die Amplifikationsprodukte beginnen, sich zu vervielfältigen. Auf diesem Wege entstehen Artefakte und unerwünschten Endprodukte (Bell et al, 1991).

Interessanterweise erreichten trotz unterschiedlicher Temperaturzyklen alle Studien vergleichbare Ergebnisse, d.h. eine maximale Sensitivität von bis zu  $10^{-6}$  der Mammaglobin-RT-PCR. Zach beschreibt in seiner Arbeit „a calculated analytical limit for the hMAM assay of one SKBR5 cell in  $10^6$  to  $10^7$  WBCs was regularly achieved“. Watson berichtet in seiner Studie „for positive controls,  $10^1$  mammaglobin-expressing MDA-MB175 human breast tumor cells were mixed with  $10^6$  human OM431 melanoma cells to yield a  $1:10^5$  breast cancer cell dilution.

#### **5.1.4. Zelllinien**

Durch den Einsatz verschiedener Zelllinien, sollte versucht werden den Zusammenhang zwischen der Expression von Mammaglobin in nicht-Mammakarzinomproben zu erklären. Dabei wurden Zelllinien der lymphatischen und myeloischen Reihe, sowie Vorläuferzellen der Erythrozyten und Zellen mit endotheliale Charakter (HU-VEC) untersucht. Mögliche Interaktionen können durch das Vorhandensein bestimmter Zellen wie Leukozyten oder Immunmodulatoren wie Interleukin bei Entzündungen oder Tumorerkrankungen entstanden sein. Allerdings erbrachten die Ergebnisse der mittels Mammaglobin -RT-PCR untersuchten Zelllinien keinen wegweisenden Befund. Wie bereits in einer unten dargestellten Studie müsste die Anwendung der Mammaglobin-RT-PCR auf weitere Zellarten bzw. Gewebe ausgedehnt werden so z.B. auf Tumoren des Gastrointestinaltraktes oder chronische Entzündungen.

#### **5.1.5. Zytokine**

Zur Erweiterung der Abklärung möglicher Interaktionen in der Studie wurden unterschiedliche Zelllinien mit 8 verschiedenen Zytokine stimuliert. Es wurden Wachstumsfaktoren ausgewählt, welche das Wachstum und die Differenzierung der myeloischen Zellen beeinflussen wie SCF, IL-3, GM-CSF und G-CSF, sowie der thrombopoetische Faktor TPO und IL-6, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der Lymphopoese spielen. Unter einheitlichen Reaktionsbedingungen sollte mit der Bandbreite von Zytokinen versucht werden, z.B. Entzündungsreaktionen zu simulieren.

### **5.2. Diskussion der im Kapitel 4 aufgeführten Ergebnisse**

Zunächst sollte die Sensitivität der neu etablierten MG-RT-PCR Methode untersucht werden. Hierfür wurden Verdünnungsreihen mit Dilutionsstufen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$  mit den Zellreihen MDA/MB-453 und MCF-7 angelegt. Bezüglich der MCF-7 Zellreihe konnte nur eine Sensitivität bis  $10^{-3}$  erzielt werden, so dass die weiteren Untersuchungen mit MDA/MD-453 durchgeführt wurden. Die Nachweisgrenze bei MDA/MB-453 lag bei  $10^{-6}$ , d.h. unter 1000000 gesunden Zellen konnte noch 1 Tumorzelle identifiziert werden (Tabelle 6). Im Protokoll von Zach ist eine Sensitivität von  $10^{-6}$  bis  $10^{-7}$  beschreiben, somit konnten in der durchgeführten Studie vergleichbare Resultate eingestellt werden. Wie in der Studie von Zach beschrieben wurden auch zunächst die Verdünnungsreihen angelegt und im Anschluss der RNA-Extraktion unterzogen. Unklar bleibt, inwieweit die in-vitro erzielte Sensitivität der Methode sich auf in-vivo Untersuchungen an Patientenproben übertragen lässt. Es ist davon aus-

zugehen, dass es bei den verschiedenen Zellreihen zu unterschiedlichen Transkripten kommt und so dass Verahnten im Bezug auf klinische Proben unklar bleibt.

Im weiteren Verlauf wurde die Mammaglobin-RT-PCR auf 80 Proben von Patientinnen angewandt und erwies sich zunächst als erfolgreich. 33% der Proben, in diesem Zusammenhang alles Proben von Patientinnen mit metastasiertem Tumorstadium oder positiven Lymphknotennachweis, erbrachten ein positives Resultat für den Nachweis von Mammaglobin in der RT-PCR (Tabelle 7). Die Ausdehnung der Untersuchung auf nicht-epitheliale Tumoren wie CML oder AML, die als Negativkontrollen gedacht waren, führte zu unerwarteten Ergebnissen. 12% der Proben ergaben ein positives Resultat für die MG-RT-PCR (siehe Tabelle 9). Um die Ursachen für diese Ergebnisse zu verstehen, schloss sich eine umfangreiche Untersuchungsreihe mit verschiedenen Tumorzellreihen an. So wurde zunächst unter gleicher Verteilung verschiedener Zellreihen, lymphatischen oder myeloischen Ursprungs, die Mammaglobin- RT-PCR auf diese Proben angewandt. Im weiteren Verlauf wurden diese Zellreihen und zusätzlich Patientenproben, von nicht epithelialen Tumoren, nach einem festgelegten Schema durch unterschiedliche Zytokine stimuliert und im Anschluss der Mammaglobin- RT-PCR unterzogen. Der Einsatz unterschiedlicher Zytokine sollte näherungsweise die in-vivo Interaktion unterschiedlicher Zellpopulationen miteinander widerspiegeln. Ziel war es ursächliche biologische Einflussfaktoren und Interaktionen klären zu können. Vor Einsatz der Stimulation durch die Zytokine zeigten bei den Zellreihen nur die Fibroblasten in allen untersuchten Proben ein positives Resultat. Die HL-60 und Raji Proben zeigten initial negative Ergebnisse. Die Zellreihen K-562, U-937, TF-1 erbrachten in einigen Proben einen positiven, in den anderen Proben keinen Nachweis für die Expression von Mammaglobin. Zwischen den Zellen myeloischen oder lymphatischen Ursprungs zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede.

Das Bild wandelte sich deutlich nach Stimulation der Tumorzellreihen (Raji, HL60, Fibroblasten, K562, TF-1, U 937) durch die Wachstumsfaktoren (Tabelle 10). Der Anteil an positiven Resultaten stieg, von vor Stimulation errechneten 31%, auf 50% in einigen Fälle auf 78% an. Nach Stimulation der Zellreihen mit GM-CSF und FLT-3 stieg die Expression von Mammaglobin, im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben, signifikant an ( $p < 0,05$ ). GM-CSF induziert die Proliferation von neutro-, eosinophilen- und basophilen Granulozyten sowie die der hämatopoetischen Vorläuferzellen. FLT-3 fördert die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen auch der CD34+ Zellen. Beiden Zytokinen ist die Fähigkeit gemein, das Wachstum von dendritischen Zellen zu fördern (Daro E. et al, 2002). Die anderen Zytokine führten zu einem Anstieg der Detektion von Mammaglobin zwischen 19% und 41%, die sich nach Auswertung mittels des T-Tests als nicht signifikant herausstellten (Tabelle 10).

Die sich anschließende Stimulation der Patientenproben durch Zytokine erbrachte weniger deutliche Resultate im Vergleich zu den im Vorfeld untersuchten Tumorzellreihen. Initial zeigte keine der Patientenproben einen positiven Nachweis für Mammaglobin. Nach Stimulation zeigten die Patientenproben deutlich weniger positive Ergebnisse im Vergleich zu den oben beschriebenen, vorab untersuchten Zelllinien. Der prozentual größte Anstieg fand sich im Gegensatz zu den Zelllinien bei den zugesetzten Wachstumsfaktoren INF $\gamma$  und IL-3. Lediglich bei GM-CSF das mit 25% ebenfalls im oberen Bereich lag, fand sich ein vergleichbares Ergebnis mit den Tumorzelllinien. Nach Auswertung mittels t-Test erwies sich nur die Expression von Mammaglobin nach Stimulation mit TPO als signifikant ( $p < 0,042$ ). TPO wird in der Leber produziert und fördert als Zytokin die Megakaryo -und Thrombopoese. Kakeda (Kadeka et al, 2002) beschrieb in der von ihm durchgeführten Studie einen positiven Effekt von TPO auf die hämatopeotischen Stammzellen, sowie Vorläuferzellen. Es kam zum Anstieg sowohl der Leukozyten als auch der Erythrozyten. Die mit den Interleukinen IL-3, IL-6 und IL-1 $\beta$  stimulierten Proben verzeichneten einen nur sehr geringfügigen Anstieg für die Expression von Mammaglobin.

Unklar bleiben die differierenden Resultate der verschiedenen Proben in den Stimulationsversuchen, denn die Zusammensetzung ist hinsichtlich der Zelltypen ähnlich. Es finden sich Zellen der myeloischen und lymphatischen Reihe, sowie Zellen epithelialen (Fibroblasten) und mesenchymalen Ursprungs (Sarkom). Der Versuchsaufbau und die Versuchsbedingungen sind nicht verändert worden. Allerdings bleibt festzuhalten, dass durch Stimulation mit Zytokinen die Expression von Mammaglobin induziert werden kann bzw. signifikant gesteigert werden kann.

### 5.3. Vergleich der dargestellten Ergebnisse mit aktuellen Publikationen

In der Literatur fanden sich keine vergleichbaren Arbeiten, die eine Untersuchung hinsichtlich der Mammaglobin-RT-PCR und möglicher Interaktionen durch Zytokine aufzeigten. Alle Autoren beschrieben Mammaglobin als spezifischen Marker und die RT-PCR als gut einsetzbar für die Detektion von residuellen Tumorzellen.

Lediglich eine Arbeit von Jung (Jung et al, 1998) weist auf mögliche Interaktionen der RT-PCR von CK-19 und CEA im Zusammenhang mit der Detektion von residuellen Tumorzellen hin. Die in dieser Studie ausgewählten Proben aus Knochenmark, Leukapherese oder peripherem Blut von gesunden Spendern, Patienten mit hämatologischen Malignomen, Abdominaltumoren und chronischen Entzündungserkrankungen lassen sich mit der Zusammensetzung der Proben in vorliegender Arbeit vergleichen. Es handelte sich auch um eine nested-RT-PCR mit ähnlichen Reaktionsbedingungen. Die Stimulation erfolgte mit den Zytokinen IL-3, IL-6, GM-CSF, SCF, INF $\gamma$  und G-CSF über 7 Tage. In der nach 7 Tagen durchgeführten CK-19-RT-PCR zeigten sich positive Resultate bei der nicht stimulierten CK-19 Probe und nach Stimulation mit allen 6 Zytokinen bei den Knochenmarkproben und bei IL-3, IL-6 und INF $\gamma$  bei den Leukaphereseproben. Die CEA-RT-PCR zeigte nur nach Stimulation mit dem Zytokin INF $\gamma$  sowohl bei den Leukapherese als auch den Knochenmarkproben ein positives Ergebnis. Diese Resultate bestätigen, die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Möglichkeit, verschiedene Tumormarker in unterschiedlichen Proben durch Zugabe von Zytokinen zu induzieren. Jung kommt zu folgender Schlussfolgerung CEA ist nur durch INF $\gamma$  induzierbar. Es bleibt weiter abzuklären, ob dies ein Nachweis für eine spezifische Induktion ist. Bei der durchgeführten CK-19 RT-PCR zeigte sich in 50% der Fälle bei den Proben von Patienten mit chronischen Entzündungen ein positives Resultat. Die mit G-CSF stimulierten Stammzellen zeigten kein positives Ergebnis in der durchgeführten CK19-RT-PCR. Dieses erfolgte erst nach weiterer Stimulation mit Zytokinen. Insofern scheint die Ursache für die Interferenzen bei CK-19 noch nicht geklärt zu sein. Vielleicht waren es Mediatoren der chronischen Entzündung oder zugesetzte Stromazellen. Es gilt weiter den Mechanismus abzuklären, der zu den „falsch-positiven“ Resultaten geführt hat bzw. zusätzliche Marker einzuführen, die Mediatoren der Entzündung detektieren. Bei negativen Ergebnissen kann allerdings davon ausgegangen werden, dass sich tatsächlich keine residuellen Tumorzellen mehr in der Probe befinden.

So traf Jung am Ende die Aussage, dass beide untersuchten RT-PCR-Methoden noch nicht als Standardmethoden eingesetzt werden können und sich weitere Untersuchungen über die Interaktionen anschließen müssen.

Zum Vergleich der CEA-PCR und der CK-19-RT-PCR mit einer Standardmethode, der Immunzytochemie, untersuchte Jung mit G-CSF stimulierte Stammzellen von Patienten mit nicht-epithelialen Tumoren, sowie mit G-CSF stimulierte Stammzellen von Patientinnen mit Mammakarzinom. Alle Proben waren positiv für die CEA-PCR, 58% für die CK-19-PCR und 50% für die Immunzytochemie. Betrachtet man diese Zahlen kann man bei 60% Übereinstimmung von einer hohen Diskordanz sprechen. Ergänzende Untersuchungen hierzu wurden durch Vergleich der Ergebnisse von Leukaphereseproben von Patientinnen mit Mammakarzinom mittels der CK-19-PCR und der Immunzytochemie durchgeführt. Nur 3

(25%) der Proben zeigten bei beiden Methoden negative Ergebnisse; in 42% (5 Proben) der Fälle waren die Resultate diskordant.

In der in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen ist der Anteil an Übereinstimmungen größer, im Vergleich zur CK-20-RT-PCR und Immunzytochemie aber im Ergebnis schlechter. Von den insgesamt 66 untersuchten Proben von Patientinnen mit Mammarkarzinom fanden sich in 4,5% der Fälle sowohl bei der Immunzytochemie als auch der Mammaglobin-RT-PCR positive Ergebnisse. 59% zeigten übereinstimmend ein negatives Resultat. In 36% waren die Ergebnisse diskordant. Im Bezug auf die Zytokine, lassen sich in der aktuellen Literatur keine direkten Zusammenhänge für die in dieser Studie gefundenen Veränderungen erschließen.

Als Protokoll für die dargestellte Arbeit diente die Studie von Zach (Zach et al, 1999). Die Extraktion erfolgte mit einem anderen Kit (TRIZOL reagent, Fa. Life Technologies). Es wurden die gleichen Primer eingesetzt, der Temperaturzyklus wurde, wie im Ergebnisteil beschrieben, erweitert. Insgesamt wurden 114 Proben von Patientinnen mit Mammarkarzinom untersucht, 25% von diesen erbrachten einen positiven Mammaglobinnachweis. Als Negativkontrollen dienten gesunde Spender und 41 Patienten mit anderen Tumorerkrankungen, 2 von diesen mit positivem Mammaglobinnachweis. Alle Proben stammten aus peripherem Blut, nicht wie in der vorliegenden Arbeit auch aus Leukapheresen oder Knochenmark. Trotz Übereinstimmungen im Untersuchungsaufbau und bei den verwendeten Materialien ist die Zahl der falsch-positiven Proben bei Zach verschwindend gering im Gegensatz zu den 11% in der vorliegenden Arbeit. Es schließt sich die Frage an, ob Zach, hätte er auch Leukapheresen oder Knochenmarksproben, nicht nur peripheres Blut untersucht, zu anderen Ergebnissen gekommen wäre. Desweiteren bleibt anzumerken, dass der von Zach für die RT-PCR gewählten Temperaturzyklus sowohl in der Anzahl der Zyklen als auch den Zeiten deutlich kürzer war, und in der Folge einen Einfluss auf die differierenden Ergebnisse haben könnte.

Als weitere Veröffentlichung ist eine italienische Studie (Corradini et al) anzuführen. Sie untersuchte mittels der RT-PCR und den Markern CEA, CK-19, CK-20, MUC-1, EGFR, Maspin und Mammaglobin 80 Proben von Patientinnen mit Mammarkarzinom. Die Proben stammten aus peripherem Blut, Leukapheresen und Knochenmark. 38 dieser Patientinnen wurden zum Untersuchungszeitpunkt mit einer Hochdosischemotherapie behandelt. Die Anzahl der Proben und die Materialien lassen sich gut mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichen. Corradini kam zu folgendem Ergebnis, Mammaglobin wurde in 97% der Mammarkarzinomproben detektiert, nicht in den Negativkontrollen und ist somit gut einsetzbar für die Detektion der Minimal Residual Disease. Bemerkenswert ist, dass die Negativkontrollen, die sich aus Knochenmark, Leukapheresen und peripherem Blut von gesunden Spendern, sowie Patienten mit hämatologischen Tumoren zusammensetzten, keine falsch-positiven Resultat erbrachten ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Grunewald (Grunewald, 2002) kam hingegen zu anderen Resultaten. So ließ sich mittels nested RT-PCR Mammaglobin nicht nur in Proben (insgesamt 152 Proben) von gesundem Brustdrüsengewebe bzw. Mammarkarzinomproben nachweisen, sondern auch im Gewebe aus dem Ovar, dem Uterus, sowie der Zervix, sowohl bei gesunden als auch bei an einem Tumor erkrankten Spenderinnen. Allerdings fanden Grunewald, und das würde die vorliegenden Untersuchungen unterstützen, eine, wenn auch niedrige Expression von Mammaglobin in Gewebe gesunden oder mesenchymalen Ursprungs. Wie aber bereits in der Studie von Corradini beschrieben, zeigte keine der von Grunewald eingesetzten Negativkontrollen ein falsch-positives Ergebnis. Die Proben (124) stammten entweder von gesunden Spendern oder von Spendern mit hämatologischer Erkrankungen, von der Anzahl umfangreicher als die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Negativkontrollen und von der Zusammensetzung her vergleichbar. In seiner Schlussfolgerung bezeichneten Grunewald Mammaglobin als einen

sensitiven Marker zur Detektion von Mikrometastasen bei Patientinnen mit Mammakarzinom oder anderen gynäkologischen Tumoren.

Von Li (Li et al, 2002) et al kommt eine weitere populären Studie. In dieser Studie wird unter Einsatz von 56 Proben von Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht, ob sich die Expression von Mammaglobin vor und nach Hochdosischemotherapie verändert. Initial konnte in 30,4% der Proben ein positiver Nachweis für Mammaglobin erbracht werden. In der post Chemotherapie durchgeführten RT-PCR zeigten 41,4% der Proben keinen Nachweis mehr für Mammaglobin. Für Li S. ein klarer Hinweis, Mammaglobin einzusetzen, um eine Aussage über den Verlauf und die Prognose von Brustkrebs treffen zu können. Ob auch eine gesundes Kollektiv bzw. Proben von verschiedenen Tumorerkrankung als Negativkontrollen untersucht wurden, kommt in seiner Studie nicht zum Ausdruck. Die Einbeziehung anderer Tumorerkrankungen bzw. die Untersuchung eines gesunden Kollektivs hätten ihn möglicherweise zu einer anderen Schlussfolgerung kommen lassen.

Abschließend sind noch die Erkenntnisse einer japanischen Forschergruppe Aihara (Aihara et al, 2000) zu erwähnen. Sie untersuchten die Detektion von Mammaglobin in unterschiedlichen Tumoren des Gastrointestinaltraktes und deren Lymphknotenmetastasen. Die Resultate waren unerwartet, eine Mammaglobinexpression konnte in jedem der unterschiedlichen Tumore nachgewiesen werden, ebenso in den Lymphknoten. Führend waren Tumoren des Kolons und Magens und die Lymphknotenmetastasen des cholangiozellulären Karzinom. Ein weiterer Hinweis dafür, dass sich weitere Untersuchungen über Mammaglobin anschließen sollten.

## 6. Schlussfolgerung

Das Behandlungskonzept des Mammakarzinoms hat sich in den letzten Jahren mit der Möglichkeit der Hochdosischemotherapie und der autologen Knochenmarktransplantation gewandelt. Abhängig vom Tumorstadium lassen sich im Knochenmark oder Stammzellen Mikrometastasen nachweisen. Dieser Nachweis erfolgt zur Zeit mittels der Immunzytochemie als Standardverfahren. Die Reverse-Transkriptase-Polymerasenkettenreaktion wird als neueres Verfahren mit einer der Immunzytochemie überlegenen Sensitivität geschätzt. In der Literatur wird eine Sensitivität von bis zu  $2 \times 10^{-6}$  beschrieben, für die untersuchte MDA/MB Mammakarzinomzelllinie konnte eine maximale Sensitivität bis  $1 \times 10^{-7}$  erreicht werden.

Allerdings scheint die RT-PCR, wie in der vorliegenden Arbeit ausgeführt, deutlich störanfälliger zu sein. Die Störfaktoren treten bei einem Verfahren wie der Immunzytochemie mit selektiven Oberflächenantikörpern nicht auf. In diesem Zusammenhang gibt es anzumerken, dass die Übereinstimmung der Resultate zwischen der Immunzytochemie und der MG-RT-PCR bei 63% und damit die geringste Übereinstimmung zeigte.

Als neuer Gesichtspunkt erwies sich in den Untersuchungen, dass die Expression von Mammaglobin durch bestimmte Interleukine induziert bzw. gesteigert werden kann. Die eingesetzten Zytokine legen die Vermutung nahe, dass diese wie Mediatoren bei akuten oder chronischen Entzündungen die Expression von Mammaglobin induzieren können (Tabelle 10). Außerdem kommt es häufig bei verschiedenen Tumorerkrankungen zu einer Deregulation der Zytokingene und so zu einer Überexpression von Zytokinen bzw. Zytokinrezeptoren. Da in den Untersuchungen Tumorzellreihen eingesetzt wurden, ist anzunehmen, dass bereits vor Stimulation durch die zugesetzten Zytokine Zytokinrezeptoren zirkulierten oder eine Deregulation im Bereich der Zytokingene bestanden hat. Insgesamt sind die Kenntnisse über den Mechanismus und die vordringlich beteiligten Zytokine noch unzureichend. Interessanterweise fanden sich bei den beiden Stimulationsreihen jeweils unterschiedliche Zytokine, die zu einem signifikanten Anstieg bei der Expression von Mammaglobin führten: GM-CSF, TPO und FLT-3, in ihrer Funktion und Wirkungsweise verschiedene Wachstumsfaktoren. Einen weiteren Diskussionsansatz lieferte eine Studie von Zach (Zach, 1999), in der 2 falsch-positive Negativkontrollen, Mantelzell-Lymphom und Thymuskarzinom, aufgetreten waren. Bei Lymphomen liegt die typische Region für ein Genrearrangement im Bereich t(11;14)q(13;32). In dieser Region ist auch das Mammaglobin lokalisiert, so dass eine mögliche Translokation in diesem Bereich zur der Mammaglobin-Expression geführt haben könnte. Möglicherweise lassen sich anhand dieser Erkenntnis einige der 11% falsch-positiven Resultate der untersuchten MG-RT-PCR Negativkontrollen erklären. Vergleicht man nun die Zellarten, die den verschiedenen Proben zugrunde lagen, so kommt man zu folgendem Ergebnis: bei den Zelllinien stammen K562 und HL60 der myeloischen Reihen, Raji und TF-1 der lymphatischen Reihe ab. Bei den Patientenproben überwogen die Zellen der lymphatischen Reihe bzw. werden auch Zellen von gesunden Spendern untersucht. Nach dieser Verteilung könnten man mutmaßen, dass sich in Zellen der myeloischen Reihe durch die zugesetzten Wachstumsfaktoren leichter Mammaglobin induzieren lässt als in den Zellen der lymphatischen Reihe (siehe Tabelle).

Anzumerken bleiben noch die von Aihara (Aihara 2000) beschriebenen Ergebnisse, demnach konnte Mammaglobin auch in Tumoren des Gastrointestinaltraktes und deren Metastasen nachgewiesen werden. Damit scheint, wie bereits sich in der vorliegenden Studie angedeutet, die Expression von Mammaglobin auch in anderen Geweben möglich zu sein. Veränderungen. Insofern sollte die Aussage Mammaglobin ist ein selektiver Marker, der nur in Brustdrüsengewebe und in dem Lipophilanteil der Tränenflüssigkeit exprimiert wird, kritisch überdacht werden.

Die Schlussfolgerung aus diesen Erkenntnissen ist, dass eine spezifische Amplifikation bei der MG-RT-PCR durch biologischen Interferenzen gestört werden kann und so zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Mit knapp 12% falsch-positiven Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit kann die Mammaglobin-RT-PCR nicht in der Routinediagnostik zur Detektion von Mikrometastasen bei Patientinnen mit Mammakarzinom eingesetzt werden. Es bleibt abzuwarten, ob die Methode und der Einsatz in Zukunft verbessert werden kann. Abschließend bleibt noch anzumerken, dass vergleichbare Resultate auch für die CEA- und die CK19- RT-PCR beschrieben wurden.

## **7. Literaturverzeichnis:**

**Aihara T., Fujiwara Y., Mikaye Y., Okami J., Okada Y., Iwao K., Sugita Y., Tomita N., Sakon M., Shiozaki H., Monden M.,**  
 Department of Surgery II, Osaka Medical School, Siuta  
 Cancer Lett 2000 March 13; 150(1): 79-84

**ATCC, Rockville, MD, USA**

**Beck L., Bender HG, Diedrich K., Diertl W., Friese K., Hepp H., Kreienburg R., Schneider H., Der Gynäkologe,** Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 2004

**Becker, R., Darrow, C., Zimonjic, D., Popescu, N., Watson, M. and Fleming, T. (1998),**  
 Identification of Mammaglobin B, a Novel Member of the Uteroglobin Gene Family.  
 Genomics 54, 70-78

**Berois, N., Varangot, M., Osinaga, E., Babino, A., Cagnault, L., Muse, I. and Roseto, A.**  
 Detection of Rare Human Breast Cancer Cells. Comparison of an Immunomagnetic  
 Separation Method with Immunocytochemistry and RT-PCR  
*Anticancer Research* 17, 2639-2646, 1997

**Bloom and Richardson, Histologic Grade of Breast Cancer, 2003**

**Chomczynski, P., Sacchi, N.**  
 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform  
 extraction  
*Analytical Biochemistry*, volume 162, Issue 1, April 1987, p 156-159

**Corradini P., Voena C., Astolfi M., Delloro S., Pilotti S., Arrigari G., Bregni M., Pileri A., Gianni AM.,** Maspin and Mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR  
 detection of minimal residual disease with breast cancer.  
*Department of Hematology, Istituto Scientifico H.S., Raffaele, Milan, Italy*

**Daro E., Butz E., Smith J., Teepe M., Maliszewski CR., McKenna HJ.,**  
 Comparison of the functional properties of murine dendritic cells generated in vivo with flt3  
 ligand, gm-csf and flt-3 ligand plus gm-csf  
 Department of Immunobiology, Immunex Corporation, Seattle  
 Cytokine 2002 Feb; 17(3): 119-30

**Datta, Y.H., Adams, P.T., Drobyski, W.R., Ethier, S.P., Terry, V.H. and Roth, M.S.**  
 Sensitive Detection of Occult Breast Cancer by the Reverse-Transcriptase Polymerase Chain  
 Reaction  
*Journal of Clinical Oncology*, Vol. 12, 475-482, 1994 et al 1994

**Deeg, H.J., Klingmann, H.-G., Phillips, G.L.,**  
 A Guide to Bone Marrow Transplantation

DSMZ Dept. Of Human and Animal Cell Cultures by Deutsche Sammlung von  
 Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

**Fidler, I.J.,**

Cancer metastasis

*British Medical Bulletin* (1991), Vol. 47, No.1, pp 157-177

**Fields, K.K., Effenbein, G.J., Trudeau, W.L., Perkins, J. B., Janssen, W.E. and Moscinski, L.C.**

Clinical Significance of Bone Marrow Metastases as Detected Using the Polymerase Chain Reaction in Patients with breast Cancer Undergoing High-Dose Chemotherapy and Autologous Bone Marrow Transplantation

*Journal of Clinical Oncology*, Vol. 14, No 6, 1868-1876, 1996

**Grunewald K., Haun M., Fiegl M., Urbanek M., Muller-Holzner E., Massoner A., Riha K., Marth C., Gastl G.**

Mammaglobin expression in gynecologic malignancies and malignant effusions detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction

*Lab Invest* 2002 Sep; 82 (9): 1147-53

**Joshi, SS., Nowak DJ., Messbarger L.,**

Levels of detection of tumor cells in human bone marrow with or without prior culture

*Bone Marrow Transplant* 1990; 6; 179 – 83

**Jung, R., Krüger, W., Hosch, S., Holweg, M., Kröger, N., Gutensohn, K., Wagener, C., Neumaier, M. and Zander, A. (1998).**

Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro.

*Br. J. Cancer* 78, 1194-1198

**Kakeda M., Kyuno J., Kato T., Nishikawa M., Asashima M.**

Role of the Thrombopoietin (TPO)/Mpl system: c-Mpl-like molecule/TPO signaling enhances early hematopoiesis in *Xenopus laevis*

Department of Biological Science, University of Tokyo

*Dev Growth Differ* 2002 Feb; 44(1): 63-75

**Krismann, M., Todt, B., Schröder, J., Gareis, D., Müller, K.-M., Seeber, S. and Schütte, J. (1995).** Low Specificity of Cytokeratin 19 Reverse Transcriptase Polymerase Chain

Reaction Analyses for Detection of Hematogenous Lung Cancer Dissemination.

*J.Clinical Oncology* 13, 2769-2775

**Kröger, M.,** PCR, Grundlagen der PCR, (2006)

**Krüger, W., Krzizanowski, C., Holweg, M., Stockschräger, M., Kröger, N., Jung, R., Mross, K., Jonat, W. and Zander, A. (1996).** Reverse transcriptase polymerase chain

reaction detection of cytokeratin-19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients.

*J. Cancer Res. Clin. Oncology*, 122, 679-686

**Krüger, W., Lange, A., Badbaran, A., Gutensohn, K., Kröger, N., Zander, A.R.,**

Detection of disseminated epithelial cancer cells by liquid culture - factors interfering with the standardization of assays

*Cytotherapy* (2003) Vol.5, No. 3, 252-258

**Krüger, W., Datta, C., Badbaran, A.,**

Immunomagnetic tumor cell selection-implications for the detection of disseminated cancer cells.

*Transfusion* 2000; 40: 1489-93

**Kvalheim, Gunnar**

Purging of Autografts: Methods and Clinical Significance

*The Finish Medical Society DUODECIM, Ann Med* 28, 167-173, 1996

Laborprotokolle KMT-Labor-II-WHK-Protokoll: PCR-Prot.-Version vom 11.06.1999

**Landys, K.,**

Prognostic Value of Bone Marrow Biopsy in Breast Cancer

*Cancer* 49: 513-518, 1982

**Lehrer, R.I., Guorong, X., Abduragimovet,A., Dinh, N.N., QU, X.-D, Martin, D. and Glasgow, B.J.**

Lipophilin, a novel heterodimeric protein of human tears

*FEBS Letters* 432, 163-167, 1998

**Li S., Li J., Luo C., Yu B., An P., Cai H.**

Department of General Surgery , Beijing Army General Hospital

Expression of human mammaglobin mRNA in peripheral blood of breast cancer and their implications

*Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2002 Mar, 40(3). 168-70

**Mangold, C., Krempien, B., Kaufmann, M., Schwechheimer, K. and Schettler, G.**

The Value of Bone Marrow Examination for Tumor Staging in Breast Cancer

*Clinical Onkology, Springer Verlag*, 1988

**Medical Organisation Heidelberg**, Brustkrebs, 2004

**Niederle, Bergmann, Ganser (1996)**, Zytokine, Hämatopoetische Wachstumsfaktoren,

*Gustav Fischer Verlag*, 1996

**Pantel, K., Dickmanns, A., Zippelius, A.**

Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines

*J Natl Cancer Institute* 1995; 87: 1162 –8

**Peters, W.P., Vredenburg, J.J. et al.**, *Journal of Clinical Onkology*11, 1132, 1993

**Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U. and Weber-Rolfs, I.**

PCR: Clinical Diagnostics and Research

*Springer Laboratory*, 1992

**Saiki, RK, Gelfand, DH., Stoffel, S., Scharf,SJ., Higuchi, R., Horn, GT., Mullis, KB., Erlich, HA.,**

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermoastable DNA polymerase

Cetus Corporation, Department of Human Genetics, Emeryville, CA

**Shipman, R.**

What to do when the PCR doesn't work

University Hospitals, Kantonspital Basel, Switzerland *Science* 1988 Jan. 29; 239(4839): 487-91

**Soeth, E., Röder, C., Juhl, H., Krüger, U., Kremer, B., Kalthoff, H.**

The detection of disseminated tumor cells in Bone Marrow from colorectal-cancer patients by a Cytokeratin-20-Specific nested Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain Reaction is related to the stage of the disease

*Int. J. Cancer (Pred. Oncol.):* 69, 278-282 (1996)

**Straka, Oduncu, Kolb, Emmerich**

Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation

*Krebsinfo, Empfehlungen, 1997*

**Tollerud, D.J., Brown, L.M., Clark, J.W., Neuland, C.Y., Mann, D.L., Pankiw-Trost, L.K., Blattner, W.A.**

Cryopreservation and long-term liquid storage of peripheral blood mononuclear cells for flow cytometry analysis; effects on cell subset proportions and fluorescence intensity

*J. Clin. Lab. Anal., 1991; 5 (4): 255-61*

**Treleaven, J. and Wiernik, P.,**

Color Atlas and Text of Bone Marrow Transplantation, 1995

**Watson M., Dintzis S., Darrow, C., Voss, L., DiPersio, J., Jensen, R. and Fleming, T.(1999),** Mammaglobin Expression in Primary, Metastatic and Occult Breast Cancer.

*Cancer Research* 59, 3028-3031

**Watson, M.A. and Flemming T.P. Mammaglobin,**

Mammaglobin, a Mammary-specific Member of the Uteroglobin Gene Family, is overexpressed in Human Breast Cancer

*Cancer Research* 56, 860-865, 1996

**Zach, O., Kasparu, H., Krieger, O., Hehenwarter, W., Grischkowsky, M. and Lutz, D. (1999).** Detection of circulating Mammary Carcinoma Cells in the Peripheral Blood of Breast Cancer Patients via a Nested Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Assay for Mammaglobin mRNA.

*J.Clinical Oncology*, 17, 2015

**Zander, A.R., Krüger, N., Schmoor C., Krüger, W., et al (June 2004).** High- Dose- Chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support compared with standard-dose chemotherapy in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes. First results of a randomized trial.

*Journal of Clinical Oncology*, Vol. 22, No 12, pp 2273-2283

**Zippelius, A., Kufer, P., Honold, G., Kollermann, M., Oberneder, R.Schlimok, G., riethmuller, G. and Pantel, K. (1997).** Limitations of reverse transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow.

*J.Clinical Onkology* , 15, 2701-2708

## **8. Danksagungen**

- Herrn Prof. Dr. med. A. Zander danke ich sehr für die Überlassung des Arbeitsplatzes und das Interesse am Fortgang der Arbeit.
- Herrn PD Dr. med. W. Krüger spreche ich meinen besonderen Dank aus für die Anregung zur Doktorarbeit und Überlassung des Themas, sowie für seine Diskussionsbereitschaft und die Anregung und Planung von neuen Experimenten.
- Frau A. Badbaran danke ich für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor.
- Den Mitarbeitern der KMT- Station sowie der Transplantationsambulanz danke ich sehr für die Hilfe bei der Probenaquiesation, die die Vielfalt der Untersuchung erst möglich gemacht haben.
- Frau S. Mumme danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit im Labor, den Einsatz und die gezielte Diskussionen der Ergebnisse.
- Herrn C. Ruedig gilt mein besonderer Dank für die sorgfältige Durchsicht der Doktorarbeit, die Mithilfe bei der Auswertung und die vielen Anregungen.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person:

**Name:** Birte Detlefsen  
**Adresse:** Siebachstraße 57  
 50733 Köln  
 Tel.: 0221/1396168  
 Mobil: 0172/5313833  
 e-mail: Birte.D@gmx.net

**Geburtstag und-ort:** 19.06.1975 in Hamburg  
**Familienstand:** ledig  
 Beruf der Eltern: Vater Diplomingenieur, Mutter Lehrerin

### Ausbildung:

07.1981 –07.1985 Grundschole Kanzlerstraße, Hamburg  
 08.1985 –08.1994 Alexander-von-Humboldt Gymnasium, Hamburg

06.1994 Abitur im Juni 1994, Note: 1,7

### Hochschulstudium:

Seit 04.1995: Studium der Humanmedizin, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf  
 04.1997: Physikum  
 03.1998: 1.Staatsexamen  
 09.2000: 2.Staatsexamen  
 12.2001: 3.Staatsexamen, Note: 1,9

### Berufserfahrung :

#### Aktuell:

01.2002-03.2002 Ärztin im Praktikum in der Pädiatrie im Kinderhospital Osnabrück  
 03.2002-06.2003 Ärztin im Praktikum in der Kinderchirurgie in Altonaer  
 Kinderkrankenhaus, Hamburg  
 07.2003-08.2005 Assistenzärztin in der Ausbildung, Kinderchirurgie, Landeskliniken  
 Salzburg  
 09.2003-zur Zeit Assistenzärztin in der Ausbildung, Kinderchirurgie,  
 Kinderkrankenhaus Amsterdamer Straße, Köln

Praktisches Jahr:

1. Terial, Kinderheilkunde, Universitätskrankenhaus Eppendorf
  2. Terial, Innere Medizin, AK Altona, Hamburg
  3. Terial, Chirurgie für 2 Monate an der Tulane University, New Orleans, USA
- Kinderchirurgie für 2 Monate, Hamburg**

Famulaturen:

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 09.1997         | Unfall- und Wiederherstellungschirurgie/AK St. Georg, Hamburg               |
| 08.1998         | Allgemeinärztliche Praxis/ Dr. Schwarz, Hamburg                             |
| 09.1998         | Pädiatrie und Gynäkologie/ B.L.Kapoor Memorial Hospital<br>Ludihana, Indien |
| 02.1999-03.1999 | Neuropädiatrie/ Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg                       |
| 09.1999         | Innere Medizin/ Mater Misericordiae Hospital, Dublin, Irland                |
| 02.2000         | Medizinische Aufnahme/AK St. Georg, Hamburg                                 |
| 04.2000         | Pädiatrie und Gynäkologie/ Benin, Afrika                                    |

Dissertation:

- |              |   |
|--------------|---|
| 11.1998-2006 | Im Zentrum für Knochenmarkstransplantation des<br>Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf<br>Thema: Evaluation der Mammaglobin –Reversen-Polymerasen<br>Kettenreaktion für die Detektion von residuellen Tumorzellen bei<br>Mammakarzinompatientinnen |
|--------------|---|

**Veröffentlichungen :**

**B. Detlefsen, S. Mumme, A. Badbaran, R. Jung, M. Neumaier, N. Kröger, A.R. Zander, W.H. Krüger.** Evaluation of cytokeratin-20-and mammaglobin-reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection of disseminated breast cancer cells. **Bone Marrow Transplant.** 2000; 25(Suppl.1):S 57 ,im **J.Clin. Oncology** 2000; 19(Suppl.1): 661a und **Cytotherapy** 2000; 2 (4):315

**W.H. Krüger, R. Jung, B. Detlefsen, S. Mumme, A. Badbaran, J. Brandes, J. Renges, N. Kröger, A.R. Zander.** Interference of cytoceratin-20- and mammglobin-reverse polymerase chain assays designed for the detection of disseminated cancer cells, **Onkologie** 2000; 23 (Suppl. 7): 58 und **Med. Oncology** 2001

**C. Schimke, T.M. Boemers, B. Detlefsen,** Congenital obstructive distal urethral membrane, *Journal of Paediatric Urology*, March 2005

**Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie, Berlin 2004**

### **Vorträge (Erstautorin):**

- Deflux versus Cohen oder welche Gründe gibt es , eine Methode mit 98-100% Erfolgsrate zu verlassen ? 41. Jahrestagung für Kinder- und Jugendheilkunde, Salzburg, Oktober 2003
- Case Report of a Polytrauma with letal axonal lesions and non-detected diaphragmatic Rupture. 33. International Symposium of Pediatric Surgery, Oberurgl, Januar 2004
- Deszendierende intramedulläre Nagelung zur Behandlung von dislozierten suprakondylären Humerusfrakturen, 45. Österreichischer Chirurgenkongreß, Klagenfurt, Juni 2004
- Deflux versus Cohen , 42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendheilkunde, Oktober 2004, Berlin
- Necrotizing Enterocolitis in Premature Twins with TTTSyndrome, 34. International Symposium of Pediatric Surgery, Oberurgl, März 2005
- Single Trocar Technique, Laparoscopic Appendectomie, 34. International Symposium of Pediatric Surgery, Oberurgl, März 2005
- Single Port Appendektomie, Pädiatrischer Nachmittag Kinderkrankenhaus Amsterdamer Straße Köln, März 2006
- Stuhlinkontinenz, Pädiatrischer Nachmittag Kinderkrankenhaus Amsterdamer Straße Köln, November 2005

### **Poster (Erstautorin):**

- Obstructive distal urethral membrane associated with penile hypospadias and hydronephrosis. ESPU, Regensburg April 2004
- Diffuse axonale Injury- 2 Fallbeispiele, 42. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendheilkunde, Oktober 2004, Berlin
- Dünndarmperforation bei frühgeborenen Zwillingen mit fetofetalem Transfusionssyndrom, 43. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Kinderchirurgie, Oktober 2005, Bremen
- Laparoskopische Appendektomie- Die Single Trokar Technik, 43. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Kinderchirurgie, Oktober 2005, Bremen
- Isolated small bowel perforation in premature twins with TTT- Syndrome, 7<sup>th</sup> European Congress of Paediatric Surgery, Maastricht, Mai 2006

## Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.